



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA CD73-ADENOSINA EN LA INDUCCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN CÉLULAS TUMORALES DE CACU A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DE TUMORESFERAS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ANGELES PONCE CHAVERO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FES ZARAGOZA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM**

**DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

CIUDAD DE MEXICO, ENERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA CD73-ADENOSINA EN LA INDUCCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN CÉLULAS TUMORALES DE CACU A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DE TUMORESFERAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ANGELES PONCE CHAVERO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FES ZARAGOZA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM**

**DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

CIUDAD DE MEXICO, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/1125/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de octubre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **PONCE CHAVERO MARÍA DE LOS ANGELES** con número de cuenta **310293390** con la tesis titulada **“Análisis de la participación de la vía CD73-Adenosina en la inducción de genes relacionados con la transición epitelio mesénquima en células tumorales de CaCU a través de la formación de Tumoresferas”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. BENNY WEISS STEIDER**
Vocal: **DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**
Vocal: **DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ**
Vocal: **DR. ALBERTO MONROY GARCÍA**
Secretario: **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme conocimiento útil y valioso para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida durante mis estudios de maestría con número de becario 959589, y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN225519.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por el tiempo, la paciencia, orientación y apoyo para la realización de este proyecto y por permitirme estar en su grupo de trabajo.

Asimismo, a los miembros del comité tutor la Dra. María Isabel Soto Cruz y el Dr. Juan José Montesinos Montesinos por el tiempo, apoyo, correcciones y sugerencias que permitieron que este trabajo se encaminara de la manera correcta.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A **Dios** por concederme una vez más obtener un logro académico, por sostenerme hasta aquí, por guardarme, por el amor, la misericordia y todas las cosas que a lo largo de mi vida he recibido inmerecidamente.

A Adair Zenteno Trejo, César Ponce Chavero y Othón Rodríguez León y sus familias por ser una gran bendición en mi vida. Gracias por el tiempo, el amor, las oraciones, los consejos, el ánimo y el interés brindado durante este tiempo.

A las maestras Mercedes y Pao por permitirme compartir y disfrutar este hermoso servicio con ustedes. Gracias por enseñarme, por su amor e interés.

A los miembros de la iglesia “Confraternidad Cristiana en Nezahualcóyotl” por todo el amor, el interés, las intercesiones, el apoyo, los consejos y todo lo compartido con mi familia y conmigo a lo largo de este tiempo. ¡Dios les recompense!

A los miembros del jurado el Dr. Benny Weiss Steider, la Dra. Rebeca López Marure, el Dr. Alberto Monroy García y el Dr. Hugo López Muñoz por su tiempo, sugerencias y correcciones que fueron indispensables para este proyecto.

Al Dr. Alberto Monroy García por los consejos, la asesoría y el apoyo recibido durante este tiempo.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por la ayuda, consejos y la orientación recibida.

A la Dra. Patricia Piña Sánchez del Laboratorio de Oncología molecular de la UMIEO del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional SXXI del IMSS por permitir el uso del equipo de PCR en Tiempo Real Light Cyclers 480®.

A la Dra. Rosario García Rocha por su tiempo, disposición y valiosa ayuda para sacar adelante este proyecto y por compartir su enorme conocimiento sobre este campo.

A la M. en C. Monserrat Carrera Martínez por su apoyo, por compartir su experiencia y su conocimiento a lo largo de este tiempo y por estar dispuesta a ser una ayuda a los demás.

A mi amigo Geovanni por permitirme ser parte de su vida. Gracias por todo lo compartido a lo largo de estos años de entrañable amistad.

A Jesús González por todo el cariño, el apoyo y el ánimo que me ha dado en momentos que lo he necesitado. Gracias por estar ahí para mí. ¡Te quiero muchísimo!

A Eleazar Vela por las enseñanzas, por brindarme su amistad en tiempos difíciles, estar dispuesto a escucharme y siempre tener una palabra de ánimo.

A Gissele, Manuel, Abraham, Diana, Andrés, Anelly, David, Angélica, Nohemí y Fany gracias por su amistad, sus consejos y por permitirme compartir con ustedes momentos tan lindos.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunobiología de la FES Zaragoza y del laboratorio de Inmunología y Cáncer: Azucena, Gaby, Luis, Alejandro, Ana, Monse, Ricardo, Rosario, Katia, David, Gabriel y Adriana por los comentarios, el ánimo, la ayuda y los momentos agradables que hemos pasado.

DEDICATORIAS

A mi mamá Josefina por toda su entrega, su amor, sus enseñanzas, su tiempo, su paciencia, su apoyo, sus consejos que me han forjado toda mi vida. ¡Te amo!

A mi papá Trinidad por todo su apoyo, cariño, consejos e instrucciones tan valiosas que han sido muy importantes y lo serán toda la vida. ¡Te amo!

A mi hermano César por su amor, por estar siempre al pendiente de mí, por su tiempo, sus oraciones, sus consejos y también las llamadas de atención. ¡Te amo!

A mi hermano Fernando por su amor, porque a pesar de la distancia siempre ha estado para mí, gracias por sus consejos y el ánimo recibido. ¡Te amo!

A la memoria de mi hermano Víctor. Gracias por todo lo que compartiste conmigo: tu amor, las risas, el tiempo y los consejos. Siempre estarás en mi mente y en mi corazón. ¡Te amo!

A mis sobrinas Sofía, Victoria, Rocío y Melissa para quienes deseo lo mejor, que es una vida llena de obediencia, Amor y bendición del Señor. Anhele ser para ustedes un buen ejemplo ¡Las amo!

"Por la misericordia de Jehová no
Hemos sido consumidos, porque
Nunca decayeron sus misericordias.
Nuevas son cada mañana; grande es tu fidelidad"

Lamentaciones 3:22-23

"... Porque has sido mi amparo,
Y refugio en el día de mi angustia.
Fortaleza mía, a ti cantaré;
Porque eres, oh Dios, mi refugio, el
Dios de mi misericordia" **Salmo 59: 16-17**

"Desde el cabo de la tierra clamaré a Ti,
Cuando mi corazón desmayare llévame a
La Roca que es más alta que yo"

Salmo 61:2

"Enséñame, oh, Jehová, tu camino;
Caminaré yo en tu verdad;
Afirma mi corazón para que tema tu
Nombre" **Salmo 86:11**

LISTA DE FIGURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Cáncer.....</i>	3
1.1.1 <i>Hallmarks del cáncer.....</i>	3
1.2 <i>Cáncer Cérvico-uterino (CaCu).....</i>	4
1.3 <i>Virus de Papiloma Humano (VPH).....</i>	5
1.3.1 <i>VPH y CaCu.....</i>	6
1.4 <i>Vía adenosinérgica.....</i>	6
1.5 <i>Microambiente tumoral en CaCU.....</i>	8
1.6 <i>Hipoxia.....</i>	8
1.6.1 <i>Factor Inducible por Hipoxia (HIF).....</i>	10
1.7 <i>Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).....</i>	12
1.8 ANTECEDENTES.....	14
1.9 <i>Cultivos celulares en 3D como modelo para estudiar el cáncer.....</i>	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS	
4.1 <i>Objetivo general.....</i>	17
4.2 <i>Objetivos particulares.....</i>	17
5. METODOLOGÍA.....	18
5.1 <i>Cultivo celular.....</i>	18
5.2 <i>Generación de TE.....</i>	18
5.3 <i>Determinación de CD73 y ARs</i>	19
5.4 <i>Determinación de la actividad enzimática de CD73 por Cromatografía de Capa Fina.....</i>	19
5.5 <i>Expresión de marcadores de la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).....</i>	19
5.6 <i>Determinación de HIF-1α.....</i>	21
5.7 <i>Determinación de TGF-β</i>	21

5.8 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1 GENERACIÓN DE TE A PARTIR DE CÉLULAS TUMORALES DE CaCU.....	23
6.2 CÉLULAS TUMORALES DE CaCU CULTIVADAS EN TE MUESTRAN MAYOR EXPRESIÓN DE CD73 Y ARs EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MC	24
6.3 CÉLULAS TUMORALES DE CACU CULTIVADAS EN TE HIDROLIZAN AMP DE MANERA MÁS EFICIENTE QUE LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MC	27
6.4 CÉLULAS DE CACU CULTIVADAS EN TE SOBRE-EXPRESAN EL GEN Snail EN RELACIÓN A LAS CULTIVADAS EN MC	28
6.5 CÉLULAS TUMORALES DE CaCU CULTIVADAS EN TE MUESTRAN SIMILAR EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y PRODUCEN GRANDES CANTIDADES DE TGF- β 1.....	29
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
8. CONCLUSIONES.....	35
9. PERSPECTIVAS.....	35
10. LITERATURA CITADA.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks del cáncer.

Figura 2. Mortalidad por cáncer en la población mundial.

Figura 3. Mortalidad por CaCU en México.

Figura 4. Efecto de los componentes de la Vía Adenosinérgica sobre la célula tumoral.

Figura 5. Representación de un tumor hipóxico.

Figura 6. Regulación de HIF's en Normoxia e Hipoxia.

Figura 7. Fenómeno de Transición Epitelio-Mesénquima.

Figura 8. Esquema de una Tumoresfera.

Figura 9. Células CaSki cultivadas en Monocapa y Tumoresferas.

Figura 10. Expresión de CD73 en células tumorales CaSki cultivadas en MC y TE.

Figura 11. Expresión de RNAm de CD73 en células CaSki cultivadas en MC y TE.

Figura 12. Expresión de ARs en células tumorales CaSki cultivadas en MC y TE.

Figura 13. Actividad enzimática de CD73 en las células CaSki cultivadas en TE y MC.

Figura 14. Expresión de Factores de Transcripción asociados con la TEM en las células CaSki cultivadas en TE y MC.

Figura 15. Detección de HIF-1 α por RT-PCR en células tumorales de CaCU cultivadas en M y TE.

Figura 16. Producción de TGF- β de células CaSki cultivadas en MC y TE.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Ado	Adenosina
ADP	Adenosin Difosfato
AMP	Adenosin Monofosfato
AMPK	Adenosin Monofosfato Cinasa
AR	Del inglés Adenosine Receptors
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNT	Del inglés Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosin Trifosfato
CaCU	Cáncer Cérvico-Uterino
CD39	Ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa-1
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
CO2	Dióxido de Carbono
ER	Expresión Relativa
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
H6PD	Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa/ glucosa 1-deshidrogenasa
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HIF-1α	Factor Inducible por Hipoxia subunidad 1 alfa
HIF-1β	Factor Inducible por Hipoxia subunidad 1 beta
HIF-2α	Factor Inducible por Hipoxia subunidad 2 alfa
HIF-3α	Factor Inducible por Hipoxia subunidad 3 alfa
IARC	International Agency for Research on Cancer
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LTC	Linfocitos T Citotóxicos
M	Monocapa
ml	Mililitro
mM	Milimolar

ng	Nanogramos
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Del inglés Natural Killer
PCR	Del inglés Polymerase Chain Reaction
PHDs	Del inglés Prolyl Hydroxylases Domain
PE	Ficoeritrina
rh EGF	Recombinante Epidermal Growth Factor
rh FGF	Recombinante Fibroblastic Growth Factor
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Del inglés Real Time-Polymerase Chain Reaction
SFB	Suero Fetal Bovino
VHL	Von Hippel-Lindau
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo
TE	Tumoresfera
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µM	Micro molar

RESUMEN

El CaCU es un problema importante de salud pública en México, el cual se ha posicionado como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Entre las pacientes que padecen CaCU, la principal causa de muerte es la metástasis, por lo que resulta de gran relevancia dilucidar los mecanismos que conducen a la diseminación de las células tumorales, así como determinar los factores que influyen en este proceso. En este contexto, las condiciones del microambiente tumoral juegan un papel importante para inducir en las células tumorales la transición epitelio mesénquima (TEM), a través de la cual las células tumorales adquieren una forma alargada e incrementan su capacidad invasiva, debido a la expresión de Factores de Transcripción como Snail y Twist que son inducidos bajo condiciones de hipoxia a través de la expresión del Factor Inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) y factores celulares como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Por otro lado, nuestro grupo de investigación previamente reportó que las células tumorales de CaCU positivas a la infección por VPH tienen alta expresión de CD73 en membrana y son capaces de generar grandes cantidades de adenosina (Ado) que al interactuar con los receptores A2AR y A2BR (presentes en las células tumorales de CaCU) promueve la secreción de TGF- β al espacio extracelular, el cual, a su vez, mantiene la expresión de la ectoenzima CD73. Tomando en cuenta que la activación transcripcional de CD73 dentro del microambiente tumoral está influenciada por las condiciones hipóxicas que prevalecen en este lugar y que el cultivo de células tumorales en tumoresferas (TE) puede recrear condiciones similares a las del microambiente tumoral, en este estudio se analizó la participación de la vía CD73-Ado en la inducción de genes relacionados con la TEM. Utilizando el modelo de cultivo de TE de células tumorales de CaCU (CaSki), logramos obtener TE compactas cuyas células presentaron una expresión significativamente mayor de CD73 respecto a las células CaSki cultivadas en monocapa (MC). Además, se observó que en más del 50% de las células CaSki derivadas de TE hubo un incremento en la expresión de los receptores para adenosina A1R, A2BR y A3R. De manera interesante, se encontró que la mayor expresión de CD73 en las células cultivadas en TE correspondió con una mayor capacidad de estas células para hidrolizar al nucleótido AMP y convertirlo en Ado. Al analizar la expresión de los genes maestros de la TEM, *Snail* y *Twist*, se encontró que sólo el gen *Snail* fue sobre-expresado en las células CaSki cultivadas en TE. Dado que se ha reportado que la inducción de la TEM en células tumorales está fuertemente asociada, tanto con la expresión de HIF- 1α como con el incremento en la expresión de *Snail* y la señalización de TGF- β , al analizar la expresión de HIF- 1α y TGF- β en las células CaSki, observamos que no hubo cambios en la expresión de HIF- 1α en las células CaSki cultivadas en TE respecto a las cultivadas en MC; sin embargo, se observó que las células CaSki cultivadas en TE produjeron significativamente mayor cantidad de TGF- β en comparación con las cultivadas en MC. Estos resultados permiten sugerir que las células CaSki cultivadas bajo las condiciones de TE son capaces de adquirir características moleculares que potencian su capacidad migratoria.

ABSTRACT

Cervical cancer (CaCU) is an important public health problem in Mexico, which has been positioned as the second cause of death from cancer in women. Among patients suffering from CaCU, the main cause of death is metastasis, therefore it is of great relevance to elucidate the mechanisms that lead to the spread of tumor cells, as well as to determine the factors that influence this process. In this context, the conditions of the tumor microenvironment play an important role in inducing the mesenchymal epithelial transition (TEM) in tumor cells, through which tumor cells acquire an elongated shape and increase their invasive capacity, due to the expression of transcription factors such as Snail and Twist, that are induced under hypoxic conditions through the expression of Hypoxic Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and cellular factors such as transforming growth factor-beta (TGF- β). On the other hand, our research group previously reported that CaCU tumor cells positive for HPV infection have high expression of CD73 in the membrane and are capable of generating large amounts of adenosine (Ado) that interact with A2AR and A2BR receptors (found in CaCU tumor cells) to promote the secretion of TGF- β to the extracellular space, which in turn, maintains the expression of the ectoenzyme CD73. Taking into account that the transcriptional activation of CD73 within the tumor microenvironment is influenced by the hypoxic conditions that prevail in this place and that the culture of tumor cells in tumorspheres (TE) can recreate conditions similar to those of the tumor microenvironment, in this study, the participation of the CD73-Ado pathway in the induction of genes related to TEM was analyzed. Using the tissue culture model of TE from cervical cancer cells CaSki, we were able to obtain compact TE whose cells showed a significantly higher expression of CD73 compared to CaSki cells grown in monolayer (MC). Furthermore, it was observed that in more than 50% of the TE-derived CaSki cells there was an increase in the expression of the adenosine receptors A1R, A2BR and A3R. Interestingly, it was found that the higher expression of CD73 in cells cultured in TE correlated with a higher capacity of these cells to hydrolyze the AMP nucleotide to produce Ado. When analyzing the expression of the TEM master genes, Snail and Twist, it was found that only the Snail gene was over-expressed in the CaSki cells cultured in TE. Since it has been reported that the induction of TEM in tumor cells is strongly associated, both with the expression of HIF-1 α , and with the increase in the expression of Snail and the signaling of TGF- β , when analyzing the expression of HIF-1 α and TGF- β in CaSki cells, we observed that HIF-1 α did not show changes in expression in CaSki cells cultured in TE compared to those cultured in MC; however, it was observed that CaSki cells cultured in TE produced significantly higher amounts of TGF- β compared to those cultivated in MC. These results suggest that CaSki cells grown under TE conditions are capable of acquiring molecular characteristics that enhance their migratory capacity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer puede ser considerado como una enfermedad resultante de diversos procesos biológicos, siendo la proliferación descontrolada una de las características más reconocidas. También, el cáncer puede ser descrito como una enfermedad compleja que comienza de manera local y tiene la capacidad de diseminarse a través del torrente sanguíneo a otros órganos y de pasar desapercibidas de la respuesta inmune antitumoral.

Esta enfermedad es un problema de salud pública en el mundo por su alta incidencia (GLOBOCAN, 2020). En el cáncer se han reconocido diversos procesos que las células tumorales llevan a cabo para lograr su supervivencia en el organismo.

1.1.1 HALLMARKS DEL CÁNCER

Se ha descrito que el cáncer posee algunas características cruciales que le permiten tener éxito en el organismo las cuales han sido llamadas “Hallmarks del cáncer”. Entre estas se encuentran: una señalización sostenida de proliferación, evasión de supresores del crecimiento, activación de mecanismos de invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa y resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 1).

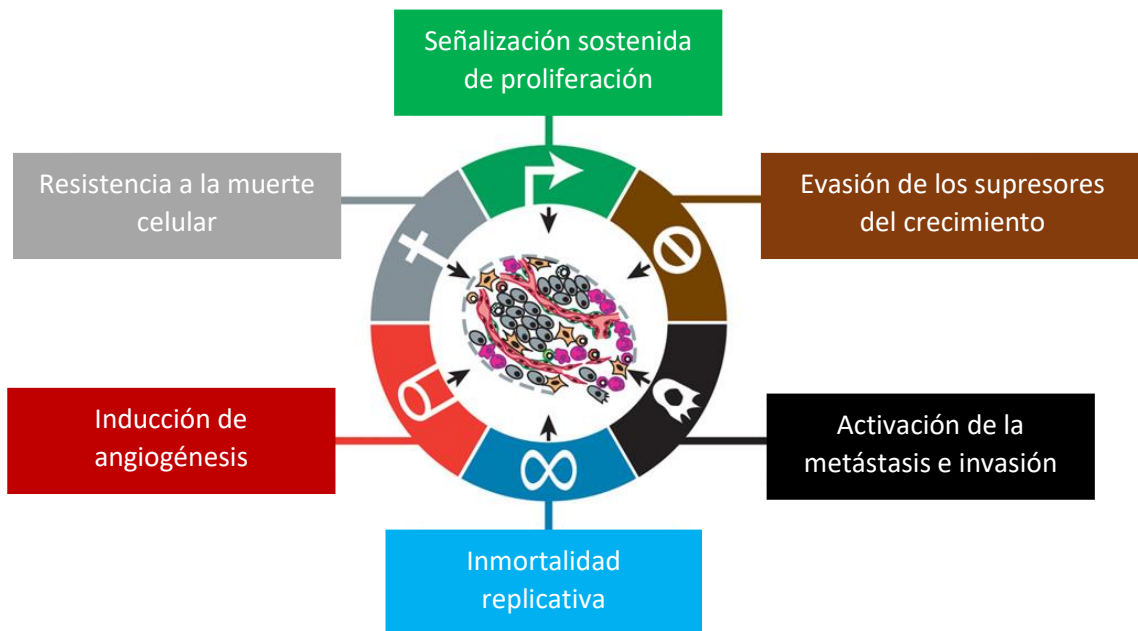


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Tomado y modificado de: Hanahan & Weinberg, 2011.

Estas hallmarks permiten a las células que ya se han convertido en malignas generar un tumor primario. Posteriormente, bajo las condiciones adecuadas les capacita para diseminarse a órganos distantes.

1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO (CaCU)

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) o también llamado cáncer de cuello uterino o cáncer de cérvix, es un problema importante de salud pública en nuestro país. De acuerdo con datos en el año 2018 se detectaron aproximadamente 10,000 casos nuevos de CaCU (INEGI, 2018). El CaCU se ha relacionado en más del 99% con la infección por el Virus de Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR) tales como VPH-16 y VPH-18 (Walboomers *et al.*, 1999) por lo que se le ha reconocido como el agente causal de prácticamente todos los casos de CaCU (Kessler, 2017).

Se ha observado que las mujeres que viven en países subdesarrollados tienen más probabilidad de padecer esta enfermedad, en parte por el poco acceso a los servicios de prevención, detección y tratamiento de la neoplasia.

En la siguiente gráfica de pastel se indican las cifras de mortalidad por cáncer a nivel mundial en la población femenina, dentro de las cuales el CaCU ocupa el cuarto lugar (IARC, 2018) (Figura 2).

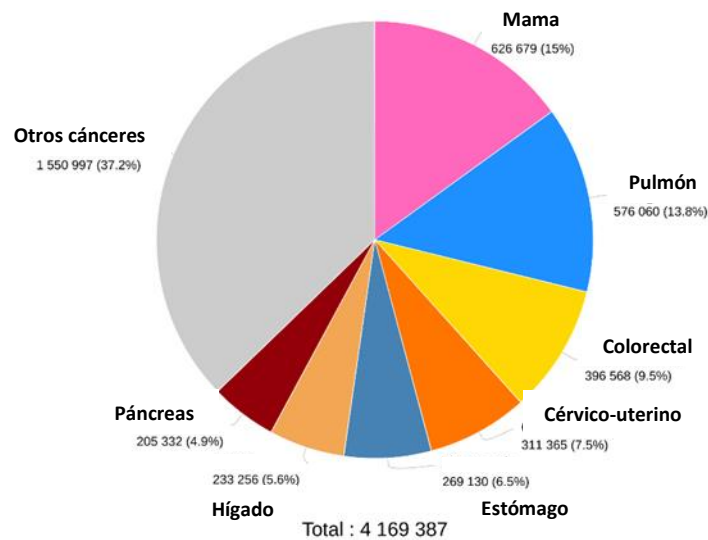


Figura 2. Mortalidad por cáncer en la población femenina mundial. Tomado y modificado de: IARC, 2018.

En el contexto nacional, el CaCU se ha posicionado como la segunda causa de muerte por cáncer, solamente superado por el Cáncer de Mama. A continuación, la figura 3, nos esquematiza dichos datos.

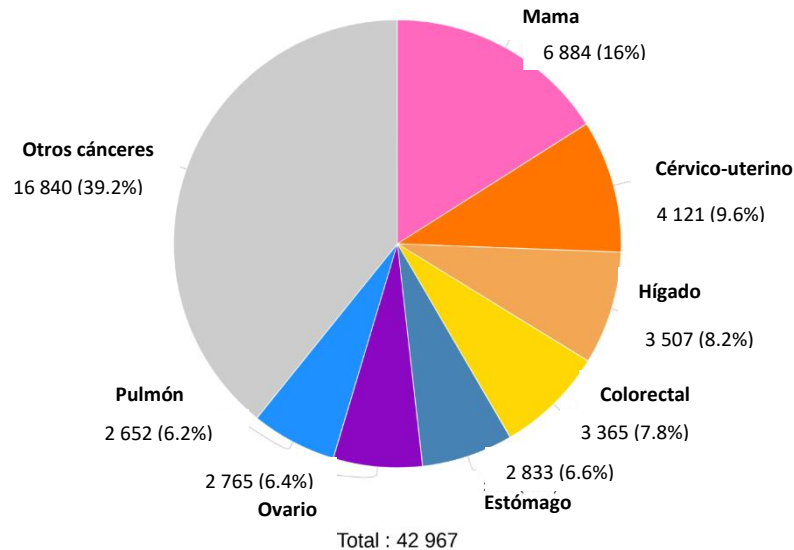


Figura 3. Mortalidad por CaCU en México. Tomado y modificado de: IARC, 2018

1.3 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es un miembro de la familia de los *Papillomavirus*. El VPH está formado por una cadena doble de ADN circular incluida en una cápside icosaédrica, sin envoltura. El material genético de este virus contiene genes que codifican para diversas proteínas no estructurales que sirven para realizar procesos biológicos como la replicación de ADN del virus, la transcripción, así como el ensamblaje viral. Además, se da lugar a proteínas tardías conocidas como L1 y L2 importantes para la conformación de la cápside, siendo la proteína L1 el mayor componente (Brianti *et al.*, 2017; IARC, 2007)

La infección con VPH es muy común en personas sexualmente activas, y en la mayoría de los casos, el sistema inmune del individuo elimina dicha infección (Dunne *et al.*, 2007). Por otro lado, la infección por VPH se ha asociado a distintos tipos de cáncer siendo principalmente el CaCU así como: cáncer de vagina, pene y ano (Bosch *et al.*, 2013).

Se han descrito más de 200 tipos distintos de VPH, de los cuales ha surgido una clasificación que los agrupa de acuerdo con su capacidad de desarrollar cáncer: los de bajo y alto riesgo (Brianti *et al.*, 2017; Walboomers *et al.*, 1999).

Los VPH de alto riesgo comprenden los tipos: -16,-18,-31,-33,-35,-45 entre otros (Sanjosé *et al.*, 2018). En la mayoría de los casos reportados de CaCU, los VPH de alto riesgo (VPH-AR) principalmente los tipos -16 y -18 están presentes (Walboomers *et al.*, 1999). Sin embargo, actualmente se ha prevenido la infección causada por estos tipos de virus de alto riesgo, así como su progresión a CaCU mediante acciones de prevención como la aplicación del esquema de vacunación a niñas de doce años.

A pesar de esta prevención, el problema de la infección y el desarrollo de la neoplasia en el cuello uterino no se han erradicado por completo. Por lo que es necesario continuar generando investigación básica acerca del VPH y del CaCU para crear estrategias tanto de tratamiento como de prevención.

1.3.1 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CaCU

Hay evidencia contundente acerca de la asociación entre la infección con un VPH-AR y el desarrollo de CaCU. Las infecciones por un VPH pueden ser eliminadas por el sistema inmunológico del individuo, sin embargo, cuando esta se vuelve persistente existe un riesgo inminente de desarrollar la neoplasia. De hecho, se considera un factor clave la infección por un VPH-AR para la progresión hacia un carcinoma; sin embargo, de las lesiones generadas por el VPH, sólo del 0.3-1.2% avanzan hacia CaCU (Gupta and Pramanik, 2019)

La historia natural del CaCU indica que antes de desencadenarse el proceso carcinogénico, las células del cérvix comienzan a experimentar una serie de cambios que en conjunto dan lugar a las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC).

1.4 VÍA ADENOSINÉRGICA

En años recientes, se ha reportado que la Vía Adenosinérgica, en la cual participan las ectonucleotidasas CD39 (ENTPD1, diphosphohidrolasa trifosfato ectonucleósido-1) y CD73 (5'- ectonucleotidasa), juega un papel importante en el desarrollo de los tumores malignos (Antonioli *et al.*, 2016; Ohta, 2016). En condiciones de hipoxia e inflamación se libera una gran cantidad de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) que son liberados en el microambiente tumoral, y son hidrolizados por CD39 (ATP/ADP) y CD73 (AMP) para generar adenosina (Ado) (Robson *et al.*, 2005; Resta *et al.*, 1998). De hecho, se ha descrito que la expresión de CD73 dentro del microambiente tumoral está regulada por el Factor de transcripción Inducible por Hipoxia 1 α (HIF-1 α) y por TGF- β (Otha, 2016).

CD73 se ha descrito como una molécula que puede promover crecimiento del tumor, angiogénesis, invasión y migración (Figura 4). Además, su expresión no sólo está limitada a células del sistema inmune o células cancerosas, sino también en el riñón, nódulos linfáticos, pulmón, cerebro, corazón, médula ósea, entre otros (Ghalamfarsa *et*

al., 2019).

A su vez, CD39 (otro componente de la vía adenosinérgica) también participa de forma activa en varios tipos de cáncer como leucemia y carcinoma de ovario correlacionando su expresión con un peor pronóstico (Turcotte *et al.*, 2017; Abousamra *et al.*, 2015)

En los últimos años, se han incrementado los reportes que apuntan hacia la vía adenosinérgica como un actor relevante en el cáncer (Huang *et al.*, 2018). En este sentido, la Ado ejerce sus funciones mediante su interacción con receptores específicos (ARs: A1, A2A, A2B y A3) acoplados a proteínas G y dispuestos en la membrana de las células blanco (Fredholm *et al.*, 2001; Vaupel y Multhoff, 2016). Se ha reportado que altas concentraciones de Ado (10-100 μ M), generadas en el microambiente tumoral hipóxico, pueden ejercer efectos importantes en el huésped: por un lado, suprimiendo la función efectora de linfocitos T citotóxicos CD8 + (LTC), células NK, células dendríticas entre otras; y, por otro, participando en la promoción del crecimiento tumoral al inducir proliferación, evasión de la respuesta inmune, invasión y metástasis de las células tumorales.

En referencia a los receptores de adenosina, se sabe que son importantes para el proceso de cáncer. Aunque el rol de cada uno, es controversial porque no se comportan de la misma forma. Por ejemplo, recientemente se reportó que A1 está asociado con actividad anti tumoral para evitar el desarrollo de glioblastoma. A2A a su vez estimula en distintos tipos de cáncer (melanoma, pulmón y mama) la proliferación por la supresión de la respuesta inmune. El A2B promueve el desarrollo del tumor mediante la regulación de angiogenina. Finalmente, el A3 está sobre expresado en células de cáncer cuando se compara con las células normales (Gorain *et al.*, 2019). Sin embargo, sus roles específicos aún no están del todo esclarecidos.

En cuanto a la expresión de la ectonucleotidasa CD73 en las células tumorales de CaCU, se ha reportado que puede estar asociada con la presencia de infección por VPH-AR, permitiendo a las células tener una alta capacidad de suprimir la proliferación, activación y funciones efectoras de linfocitos T citotóxicos a través de la generación de Ado (Mora-García *et al.*, 2017; García-Rocha *et al.*, 2018). No obstante, se desconoce el papel de esta vía en la promoción de las actividades pro-tumorales de las células de CaCU.

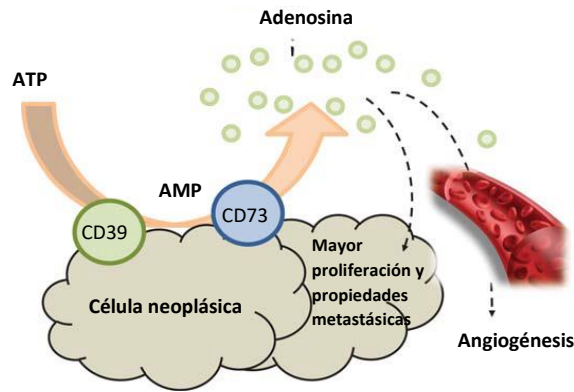


Figura 4. Efecto de los componentes de la Vía Adenosinérgica sobre la célula tumoral. Tomado y modificado de: Antonioli *et al.*, 2014.

1.5 MICROAMBIENTE TUMORAL EN CaCU

Bajo un microambiente tumoral hipóxico, las células tumorales pueden adaptarse, debido a la expresión de Factores Inducibles por Hipoxia (principalmente HIF-1 α y HIF-1 β), los cuales promueven la progresión del tumor a través de la inducción de genes asociados con la migración e invasión celular (Méndez *et al.*, 2010). Entre estos genes, se encuentran aquellos relacionados con la transición epitelio-mesénquima (TEM) de las células tumorales (Kabashima-Niibe *et al.*, 2013).

1.6 HIPOXIA

La hipoxia se entiende como la condición en la que las células de un organismo tienen poca disponibilidad de oxígeno. Es frecuente encontrar este fenómeno en algunas patologías como el cáncer. Sin embargo, también está presente en procesos biológicos como el envejecimiento y la senescencia celular (Philip *et al.*, 2013; Alique *et al.*, 2020).

Se han descrito dos formas en las que la hipoxia se manifiesta en las células. La primera se conoce como Hipoxia Transitoria o aguda caracterizada por una exposición temporal (segundos a pocos minutos) a niveles variantes de O₂. Por otro lado, la hipoxia crónica se da cuando las células son expuestas a niveles distintos de oxígeno durante algunos minutos, unas horas o incluso más tiempo (Semenza, 2000).

En un tumor sólido se pueden distinguir distintas regiones de células expuestas a diferentes concentraciones de oxígeno: normoxia, hipoxia y necrosis, por lo que el comportamiento de las células puede cambiar en estas condiciones fisiológicas diferentes.

Cuando la hipoxia está presente en las células, generalmente mueren. Sin embargo, la baja concentración de oxígeno en células tumorales puede ser considerada como un

mecanismo de selección porque posibilita a algunas células a resistir bajo condiciones de escasos nutrientes y poco oxígeno (Vaupel and Harrison, 2004).

Por lo tanto, la hipoxia provoca que las células respondan a esta condición. Distintas respuestas se han observado cuando las células están sometidas a baja concentración de oxígeno, como por ejemplo el inicio del arresto celular, diferenciación, necrosis y apoptosis (Lee and Lin, 2017), pero también podría estimular el crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis (Vaupel and Harrison, 2004).

Las células son sensibles a diversos estímulos provenientes de su microambiente, pues se ha demostrado que tienen la capacidad de detectar el oxígeno (Semenza, 2010)

El oxígeno es un elemento fundamental para las funciones biológicas de las células. Cuando los niveles oxígeno están en 40 mmHg se consideran valores normales. La hipoxia en un tumor oscila entre 0-20 mmHg de oxígeno (Vaupel *et al.*, 1989).

La figura 5, representa un tumor hipóxico y las condiciones de oxígeno a las que están expuestas las células que lo conforman.

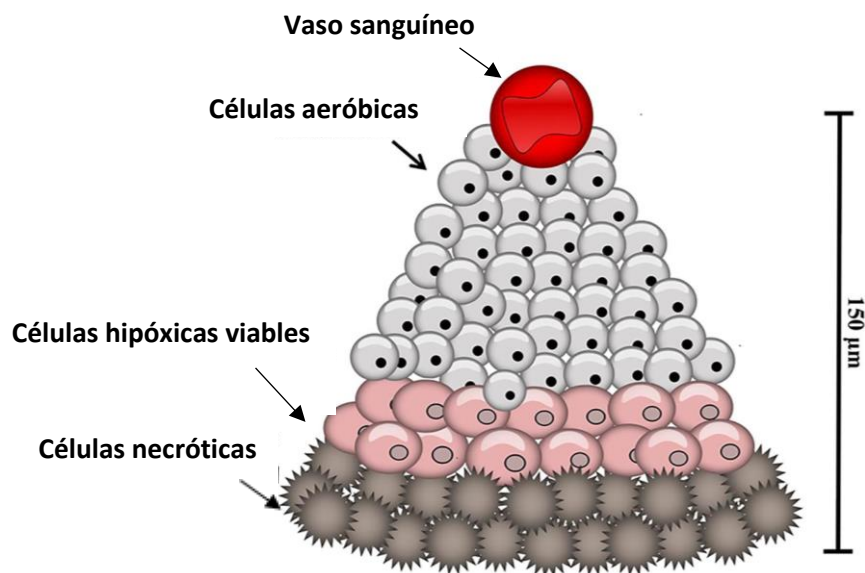


Figura 5. Representación de un tumor hipóxico. Tomado y modificado de: Al *et al.*, 2019

1.6.1 FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF)

Cuando las células están expuestas a condiciones de hipoxia, pueden adaptarse mediante elementos de respuesta a Hipoxia. Esta adaptación es desencadenada gracias al Factor de Transcripción conocido como HIF-1. HIF-1 es un heterodímero conformado por la subunidad α (HIF-1 α) y la subunidad 1β (HIF-1 β). En condiciones de normoxia, es decir, niveles normales de oxígeno, la subunidad α es degradada por señalización de ubiquitina por lo que se impide su traslocación al núcleo celular. Sin embargo, en condiciones de hipoxia se activa una vía de inhibición de degradación por lo que se permite su unión a la subunidad β para formar el heterodímero y de esta forma traslocarse al núcleo celular y favorecer la transcripción de varios genes con distintas funciones. La subunidad α está codificada por un gen localizado en el cromosoma 14q23.2 y posee un total de 16 exones. A este Factor también se le conoce como MOP1, PASD8, bHLHe78 (Gene NCBI, 2020)

Por lo tanto, HIF es el resultado de la respuesta molecular desencadenada por el estímulo de bajo oxígeno. HIF-1 se encuentra en células nucleadas (Majmundar *et al.*, 2010), está sobre expresado en células tumorales (Weidemann and Johnson, 2008; Robinson *et al.*, 2017), además de estar presente en leucocitos (Wiener *et al.*, 1996). Mientras que HIF-2 está fuertemente expresado en Macrófagos Asociados a Tumor (Talks *et al.*, 2000), y el ARNm se halla principalmente en corazón, pulmón, placenta y riñón (Tian *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1997). Finalmente, se sabe de la expresión de HIF-3 en células epiteliales alveolares pulmonares (Li *et al.*, 2006) y en conjunto con HIF-2 α son hallados en células endoteliales vasculares, renales, hepáticas y algunas mieloides (Bertout *et al.*, 2008).

En cuanto a la degradación de HIF-1 α , se sabe que es activada por VHL y mediada por ubiquitina. Cuando se bloquea la señal de degradación, HIF-1 α e HIF-1 β (también conocido como ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) se unen para translocarse al núcleo para formar un heterodímero constituyendo la forma activa de HIF-1, resultando en una regulación de diferentes genes de manera directa o indirecta (Zimma and Kurpysz, 2015; Goda and Kanai, 2012; Semenza, 2012). Por otro lado, se cree que HIF-2 α podría estar regulando otros procesos como la troncalidad más que la regulación que ejerce HIF 1.

Está reportado que HIF podría estimular la expresión de la proteína survivina e inhibir la expresión de Bid (miembro de la familia Bcl-2), una proteína pro-apoptótica.

En este sentido, si bien es cierto, el oxígeno es un regulador clave del HIF-1 α se han reportado otros factores que son importantes en la regulación de este Factor de Transcripción, como por ejemplo los oncogenes (Fraga *et al.*, 2009).

Además de su rol en cáncer, HIF-1 α se ha relacionado con otros procesos biológicos, como por ejemplo el envejecimiento y senescencia celular. Se ha reportado, que los HIF's están conservados evolutivamente y son fundamentales para la regulación de los niveles de oxígeno.

Cuando las células se encuentran a baja concentración de oxígeno, pueden ser arrestadas en el ciclo celular de manera transitoria y, por lo tanto, reducen su consumo energético. Además, son capaces de secretar factores pro-angiogénicos y de supervivencia que podrían considerarse como una forma de adaptación a la condición hipoxia a la que están sometidas (Majmundar *et al.*, 2010).

Por lo que, en condiciones hipóxicas, las células comienzan a experimentar una serie de cambios los cuales incluyen una activación de oncogenes, aumento en la vascularización, aumento en el transporte de glucosa (Gleadle and Ratcliffe, 1997)

En cuanto a la regulación de los HIF's, se han descrito enzimas con dominio Prolil hidrolasas llamadas en su conjunto PHDs (Prolyl Hydroxylases Domain) las cuales se encargan de modular a HIF (Watts and Wamsley, 2019).

En la figura 6 se aprecia la vía de regulación celular de los HIF's en condiciones de normoxia e hipoxia.

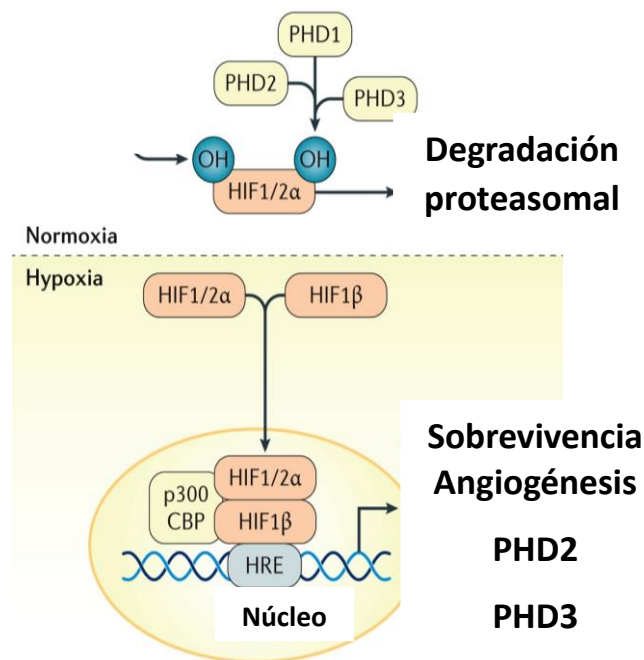


Figura 6. Regulación de HIF's en Normoxia e Hipoxia. Tomada y modificada de: Welden *et al.*, 2017. HRE: Elementos de Respuesta a Hipoxia.

1.7 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM)

El surgimiento de este término se remonta a los años 1960s, en donde la investigadora Elizabeth Hay observó una serie de cambios que experimentaban las células durante la etapa embrionaria (Hay, 2005).

Este proceso podría considerarse como una capacitación para que las células logren adquirir capacidades migratorias e invasivas.

En años posteriores a su descripción, la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) se ha estudiado bajo diversas perspectivas, pues se le ha relacionado con varios procesos como fibrosis, inflamación, regeneración de tejidos, cierre de heridas, inflamación, inmunosupresión y la quimioresistencia.

Posterior a este hallazgo, se comenzó a estudiar este proceso y ahora se sabe que la TEM es un fenómeno biológico en el cual las células comienzan a experimentar una serie de cambios. Se caracteriza por la pérdida en la expresión de marcadores epiteliales tales como E-cadherina; la adquisición de proteínas típicas de células mesenquimales, como la vimentina, N-cadherina y fibronectina; la producción de componentes de matriz extracelular (Gavert y Ben-Ze'ev, 2008); aumento en la producción de metaloproteasas; reorganización del citoesqueleto mediada por Rho GTPasas pequeñas. Además, una de las características distintivas de este fenómeno es la pérdida de la polaridad celular en donde pasan de poseer una polaridad apical-basal que es importante para mantener la comunicación celular y formar de manera adecuada el tejido al cual pertenecen y permiten su adherencia a la matriz extracelular (Troncoso *et al.*, 2017), adquiriendo a su vez, una polaridad enfrente-atrás misma que le ayuda al proceso de migración.

Por otro lado, la TEM no solamente se genera en situaciones fisiológicas como el desarrollo embrionario, o el proceso de migración celular para la reparación de heridas, sino que también se ha observado este fenómeno durante procesos patológicos como el cáncer y fibrosis (Thiery, 2002; Ye & Weinberg, 2015).

En este contexto, se ha reportado que en células epiteliales pulmonares humanas que están expuestas a experimentar fibrosis, al ser sometidas a un tratamiento con un agonista del receptor A2BR sufrieron una transformación parcial de TEM sugiriendo de esta manera que este receptor es un participante en la regulación de este proceso (Giacomelli *et al.*, 2018).

Por todo esto, es necesario conocer a profundidad el proceso de la TEM. Actualmente, se ha descrito que la TEM se da en tres pasos (Figura 7): 1) Células no migratorias, 2) Células pre-migratorias 3) Células migratorias (Troncoso *et al.*, 2017).

La primera etapa consiste en cambios en la polaridad de la célula representados principalmente por pérdidas en las uniones célula-célula. Confiriendo la preparación necesaria para realizar la migración.

En la segunda etapa, las células han perdido (aunque no totalmente) proteínas como E-cadherina, claudinas y ocludinas y al mismo tiempo comienza la adquisición de la

isoforma N de la cadherina, vimentina y metaloproteasas (Nieto, 2011). Además, se ha observado que algunos Factores de Transcripción son importantes en esta etapa como Snail, ZEB y bHLH y estos son activados por la vía de señalización dependiente de las proteínas SMAD por la acción de TGF- β (Francí *et al.*, 2006; Postigo, 2003).

Respecto a esto, nuestro grupo de trabajo reportó recientemente un mecanismo autócrino de producción de TGF- β por parte de las células tumorales. Este mecanismo consiste en que la Ado producida en el espacio extracelular por acción de las ectoenzimas CD39 y CD73 es captada por los receptores A2AR y A2BR (hallados en la célula tumoral de CaCU) los cuales, a su vez, promueven la secreción de TGF- β al espacio extracelular. Luego, el TGF- β se une a su receptor en la misma célula induciendo la expresión de la ectoenzima CD73 (García-Rocha *et al.*, 2018)

Finalmente, la tercera etapa permite que las células se vuelvan migratorias, a la vez que adquieren la capacidad de invadir e ir a sitios nuevos para formar nichos metastásicos.

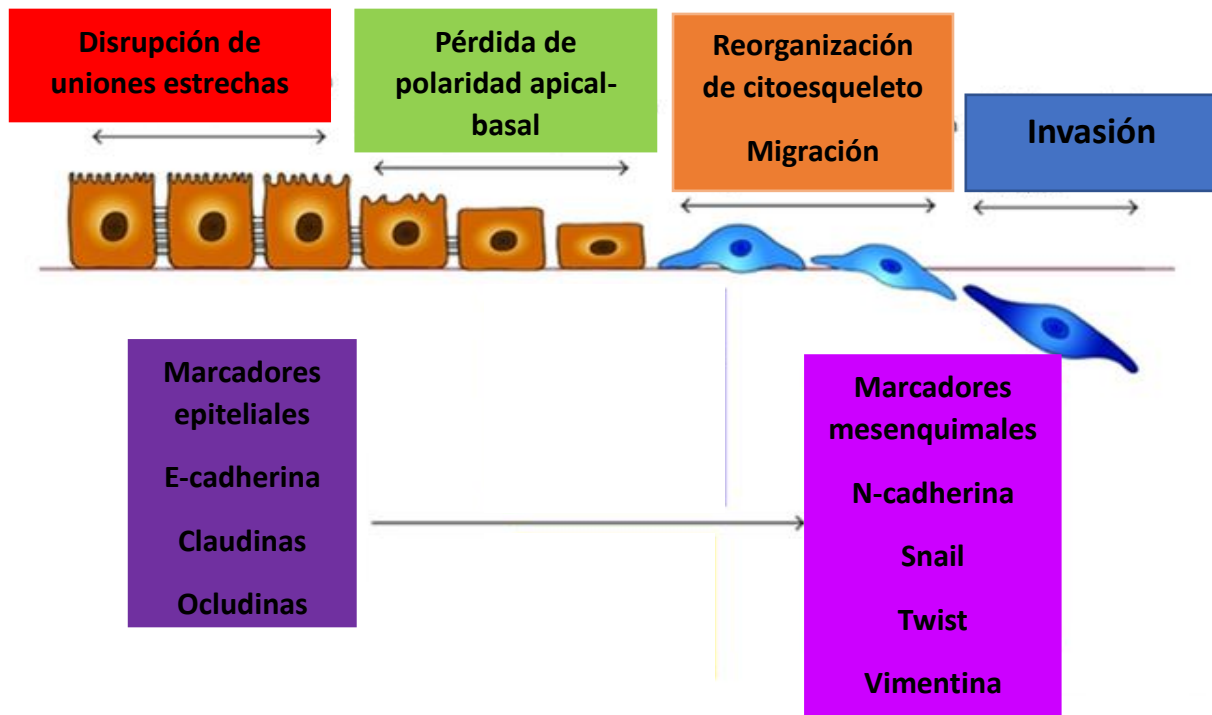


Figura 7. Fenómeno de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM). Tomado y modificado de: López-Cabrera, 2014.

Por lo tanto, resulta de interés estudiar los factores que influyen en el proceso de la TEM para lograr un mejor entendimiento sobre la metástasis. Por ello, tras diversos estudios, se ha relacionado al HIF con el fenómeno de la TEM.

1.8 ANTECEDENTES

Existen reportes en la literatura en donde se detecta hipoxia a través de HIF-1 α (Däster *et al.*, 2016) y a su vez cómo este Factor tiene influencia sobre la expresión de proteínas relacionadas con la TEM (Zhu *et al.*, 2018). De acuerdo con un reporte realizado por un grupo de investigación de China, se muestra que, usando células de cáncer de vejiga con metástasis a pulmón, la expresión elevada de HIF-1 α induce la expresión de ZEB1 (uno de los reguladores principales de la TEM) lo cual, a su vez, provoca el incremento en la expresión de Vimentina y N-cadherina (Zhu *et al.*, 2018) proteínas importantes en la Transición.

En este contexto se sabe que la condición de hipoxia por sí sola genera un ambiente adecuado para que las células tengan la capacidad de sobrevivir, así como de invadir y colonizar otros sitios del organismo (Muz *et al.*, 2015).

Por otro lado, está bien descrito que CD73 es una molécula que está vinculada a un mal pronóstico en varios tipos de cáncer. De hecho, la activación transcripcional de CD73 dentro del microambiente tumoral parece estar regulada por HIF-1 α (Synnestvedt *et al.*, 2002) y la presencia de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que se ha demostrado que estabiliza a HIF-1 α (McMahon *et al.*, 2006). Esta asociación se ha visto que puede tener un efecto notable en el proceso de Transición Epitelio Mesénquima. En células de cáncer de ovario, se ha visto que la desregulación del gen de CD3 resulta en una baja de la expresión de genes claves en la TEM como SNAIL1, TWIST1 y ZEB1 (Lupia *et al.*, 2018). Además de estos hallazgos, este mismo grupo de investigación observó que la ablación de CD73 tuvo un efecto en el fenotipo mesenquimal de las células permitiendo una disminución de N-cadherina y vimentina y un aumento de E-cadherina.

Tras un reporte en células de cáncer gástrico, se observó que la sobre expresión de CD73 repercute en la presencia de algunas moléculas importantes de la TEM como β -catenina, Snail, Vimentina las cuales aumentan su expresión, mientras que la proteína E-cadherina disminuye (Xu *et al.*, 2020)

1.9 CULTIVOS CELULARES EN 3D COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL CÁNCER

Debido a la problemática de salud que representa el cáncer, se han buscado estrategias experimentales que permitan estudiar este fenómeno de mejor manera. En ese contexto, con el propósito de simular las condiciones *in vivo* de un tumor se han utilizado modelos de cultivo en 3D los cuales confieren una ventaja fundamental respecto a los cultivos convencionales de 2D (los cultivos crecidos en monocapa); que es la de mimetizar las condiciones complejas que se generan en un tumor *in vivo*.

Entre los cultivos celulares en 3D, se encuentra el modelo de esferoide. Los esferoides están basados en la agregación celular y se consideran cultivos con alto rendimiento pues se puede obtener una alta cantidad de esferoides y la mayoría de las técnicas para realizarlos son de bajo costo (Breslin and O'Driscoll, 2013; Ricci *et al.*, 2013). La Figura 8 esquematiza un esferoide de células tumorales (o bien Tumoresfera), así como la exposición diferencial de las células a nutrientes y oxígeno en función de su ubicación en este tipo de cultivo celular.

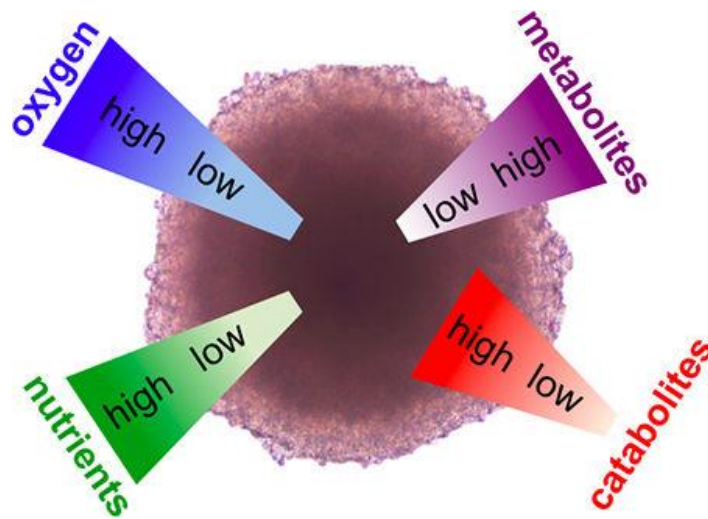


Figura 8. Esquema de una Tumoresfera. Se muestran las distintas condiciones de oxígeno, metabolitos, nutrientes y catabolitos. Tomado de: Tevis *et al.*, 2017.

Diversos grupos de investigación han utilizado este modelo de cultivo para células tumorales. Dãster *et al.*, en el 2016 generaron esferoides usando una línea celular de cáncer colorrectal denominada HT29. Además, mantuvieron las células en cultivo a diferentes tiempos, detectando condiciones hipóxicas en esferoides cuyo tamaño era mayor a 200 μm , demostrando que en los esferoides se genera hipoxia.

En CaCU también se ha reportado la generación de esferoides usando las líneas celulares SiHa, CaSki, HeLa y C33A (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2016).

Dadas las condiciones teóricas reportadas en la TE, resulta de interés usar esta estructura como modelo para estudiar la participación de la vía adenosinérgica en la inducción de genes relacionados con la TEM usando un modelo en 3D.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un modelo de Tumoresferas (TE) de células tumorales de CaCU, ¿qué papel juega la vía CD73-Ado en la inducción de genes relacionados con la TEM?

3. HIPÓTESIS

Se sabe que la vía CD73-Ado en el microambiente tumoral juega un papel importante en la promoción de actividades pro-tumorales tales como la transición epitelio mesénquima (TEM) que conduce a la migración e invasión de las células tumorales. Asimismo, se sabe que la activación transcripcional de CD73 está regulada por HIF-1 α y factores inmunosupresores como el TGF- β . Por otro lado, se ha reportado que el cultivo de células tumorales en TE genera condiciones similares a las de un microambiente tumoral. Por tanto, se espera que células tumorales de CaCU cultivadas en TE, incrementen la activación transcripcional de CD73 vía HIF-1 α y TGF- β y favorezcan la inducción de genes relacionados con la TEM.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la participación de la vía CD73-Ado en la inducción de genes relacionados con la TEM en células de CaCU cultivadas en TE.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de CD73 y ARs en las células de CaCU cultivadas en TE.
- Analizar la actividad de la vía CD73-Ado en las células de CaCU cultivadas en TE.
- Analizar la participación de la vía CD73-Ado en la inducción de genes relacionados con la TEM (Snail-1 y Twist-1) en las células de CaCU cultivadas en TE.
- Determinar la expresión de HIF-1 α en las células tumorales de CaCU cultivadas en TE.
- Determinar la producción de TGF- β de las células tumorales de CaCU cultivadas en TE.

5 . METODOLOGIA

5.1 Cultivo celular: Se utilizó la línea celular de CaCU, CaSki (VPH-16+, CD73+) la cual fue preparada de la siguiente manera: Se descongeló un vial de células CaSki (ATCC CRL-1550) y se sembraron en cajas de cultivo (Corning, USA) usando medio de cultivo RPMI (Sigma Aldrich, USA) suplementado con suero fetal de bovino (SFB) Gibco BRL (Life Technologies) al 10%. Además, se añadió al medio de cultivo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y se mantuvieron en condiciones de esterilidad, a 37°C con 5% de CO₂ en un ambiente de humedad saturante con ayuda de una incubadora (ThermoScientific, USA).

5.2 Generación de TE. De acuerdo con lo reportado por Ma et al, células de cáncer las cuales se someten a una serie de resiembras cuando son cultivadas en TE, conservan la capacidad de formación de esferas al mismo tiempo que adquieren la habilidad de formar colonias (Ma *et al.*, 2020). Basado en este método se utilizaron las células CaSki para este procedimiento. Se partió de la siembra en cultivo en Monocapa de las células CaSki las cuales después de que hubieron alcanzado el 80% de confluencia se despegaron con 4 ml de una solución de tripsina-verseno. Se dejaron incubar por 5 minutos y pasado este tiempo se colectaron las células en un tubo de 50 ml para su centrifugación a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente se contaron con la cámara de New Bauer y se sembraron un total de 10,000 células/pozo en placas de 6 pozos de ultra baja adherencia en donde permanecieron con medio Opti-Mem durante tres semanas pasando por una resiembra semanal. Terminadas las tres semanas, se procedió a disgregar las células para contarlas y hacer los cálculos pertinentes para preparar una solución con RPMI y suplementos (penicilina, estreptomycin, anfotericina y 10% SFB) cuya conformación fuera de 5 células/ml para realizar una dilución limitante en placas de 96 pozos de fondo U. Se colocaron 100 µl de medio en cada pozo y se comprobó si en algunos pozos quedó sólo una célula para obtener clonas. Las células permanecieron durante 14 días en la placa y al finalizar este tiempo se procedió a hacer un pool de las clonas. Finalmente se tomaron de estas clonas y se cultivaron en placas de ultra baja adherencia y se dejaron 14 días más en cultivo con el fin de seleccionar a las células que proliferaron bajo estas condiciones, para utilizarlas en los experimentos correspondientes.

5.3 Determinación de CD73 y ARs

La expresión de CD73 y de los ARs fue determinada mediante citometría de flujo y RT-PCR en las células tumorales cultivadas en MC y TE. Para los ensayos de citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos monoclonales específicos anti-CD73-PE (Pharmingen), anti-A1 (Novus), anti-A2A-PE (Novus), anti-A2B (Novus), anti-A3 (Novus) y Anticuerpo secundario FITC Goat anti-mouse. Para cada determinación se analizaron 10,000 eventos en un citómetro BD FACS Aria II Cell Sorter, (BD, USA) con el fin de obtener la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF).

5.4 Determinación de la actividad enzimática de CD73 por Cromatografía de Capa Fina

CD73 es una ectoenzima expresada en la membrana celular anclada mediante un Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI), la cual se distingue por ser la principal enzima en convertir el AMP en Adenosina (Ado). La Ado es fundamental para determinar su actividad enzimática.

Para realizar el análisis de la actividad catalítica de la ectoenzima CD73, 1×10^6 células CaSki cultivadas en MC o TE fueron incubadas en presencia de 5mM de AMP en medio Optimem, libre de SFB durante 6 h. Posteriormente, se procedió a cargar 1 μ l de muestra del sobrenadante de cada cultivo en placas fluorescentes recubiertas con gel (Whatman, GE Healthcare, Freiburg, Alemania). La elución de las muestras se realizó durante 1 hora empleando como fase móvil una mezcla compuesta por isobutanol: alcohol isoamílico: etoxietanol: agua amonio: en una relación 9: 6: 18: 9: 15 (Stagg *et al.*, 2010; Grunewald and Ridley, 2010). Los controles de carga fueron AMP, Ado e Ino (Sigma-Aldrich, CA, USA) a una concentración de 5mM. Por último, los compuestos se visualizaron y fotografiaron con ayuda de un transiluminador UV (UVP Bio-H System, Upland, CA, USA).

5.5 Expresión de marcadores de la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)

La expresión de los marcadores de la TEM, Snail1 y Twist1, en las células tumorales CaSki derivados de los cultivos en MC o TE se determinó mediante RT-PCR.

Inicialmente, se hizo la extracción del ARN de las células CaSki cultivadas en monocapa (MC). Las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se adicionó 1 ml de Trizol, se dejó reposar durante 5min y posteriormente se resuspendió suavemente, posteriormente el contenido se colocó en un tubo eppendorf. Para extraer el ARN de las células, se procedió a agregar 500 μ l de cloroformo agitando durante 15 segundos y

dejando incubar de 2-3 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 12,000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4°C, en una ultra-centrífuga (Eppendorf, USA). Posteriormente, se colectó la fase acuosa que contiene el ARN y se agregó 1 ml de isopropanol para que el ARN precipitara y se mezcló ligeramente. Después se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Terminado ese tiempo, se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4°C. Luego, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75%. Se agitó ligeramente y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se puso a secar el botón evitando la deshidratación total mediante inversión del tubo en papel absorbente. Se procedió a disolver el ARN en agua libre de RNAsas (20-30 µl de acuerdo con el tamaño del botón). Finalmente, se cuantificó usando un biofotómetro (Eppendorf, USA) utilizando agua milli-Q para hacer la lectura del blanco. El ARN fue tomado en un volumen de 3 µl y fue disuelto en 300 µl de agua milli-Q para su cuantificación en el equipo.

Para extraer el ARN de las células del cultivo en TE, se realizó el mismo procedimiento que con las células en MC a excepción de la forma en que se disgregaron. Para lo cual se hizo de la siguiente manera: se tomó cuidadosamente el medio de cultivo de las placas de ultra baja adherencia el cual contenía a las TE y se colocó en un tubo de 50 ml. Posteriormente, con ayuda de verseno se pusieron a incubar por 5 min. Pasado este tiempo se disgregaron mecánicamente con una micropipeta y se centrifugaron a 2 500 rpm por 5 min. Luego que se formó el botón celular, se decantó el sobrenadante y se resuspendió con el reactivo Trizol para continuar con el procedimiento de extracción de ARN, como se describió arriba.

Retrotranscripción (RT)

Para realizar el proceso de Retrotranscripción (RT) se utilizaron 500 ng del ARN previamente extraído y cuantificado. Esta cantidad fue contemplada por cada 20 µl de reacción. Con ayuda del kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, California, USA) se hizo lo siguiente: en un tubo para PCR se preparó la mezcla con 10 µl de buffer RT 2X, 1 µl de Enzyme Mix RT 20X, 7 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de la muestra biológica de interés manteniendo todo el tiempo los reactivos a una temperatura de 4°C. Se centrifugaron los tubos con las muestras para eliminar el aire y que el líquido del tubo se quedara solo en la parte baja.

La reacción de RT se hizo a una temperatura de 37°C por 60 min, luego a 95°C durante 5 min y finalmente se llevó a 4°C. Luego se almacenó en ultracongelación hasta su uso. Los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR fueron los siguientes: Snail 1 sentido 5'ATCTCCGGAGGTGGGATG 3', anti-sentido 5'GCTGCAGGACTCTAATCCAGA3'; Twist 1 sentido 5' GGCCAGTTTGATCCCAGTATT 3', anti-sentido 5' GGCATCACTATGGACTTTTCTCTATT 3'; H6PD sentido 5' CCCAGTGCTTTTCGCTCT 3', anti-sentido 5' GCTACGCTCGGATCTTGTTTC 3'.

5.6 Determinación de HIF-1 α . La expresión de ARNm de HIF-1 α en las células CaSki derivadas de TE y cultivadas en monocapa se determinó mediante RT-PCR. Una vez obtenido el cDNA proveniente de la RT, se determinó la expresión de HIF-1 α empleando los oligonucleótidos: HIF-1 α sentido 5' TTTTCAAGCAGTAGGAATTGGA 3' antisentido 5' GTGATGTAGTAGCTGCATGATCG 3' y los oligos para el gen constitutivo β -actina, sentido 5' GGGTCAGAAGGATTCCCTATG 3', antisentido 5' GGTCTCAAACATGATCTGGG 3'. Para la amplificación de estos genes se utilizó el kit PCR Master Mix (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistió de un total de 35 ciclos compuestos por la siguiente secuencia cada uno de ellos:

- 1) 94 °C – Iniciación 5 min
- 2) 95 °C – desnaturalización 30 seg
- 3) 59 °C – alineamiento 1 min
- 4) 72 °C – elongación 1 min 30 seg
- 5) 72 °C – elongación 10 min
- 6) 22 °C – enfriamiento

Posteriormente, una vez obtenidos los productos de amplificación se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa al 3% en una cámara de electroforesis. El gel fue teñido con Gel red[®]. Cada muestra fue cargada colocando 2 μ l de buffer de carga y 5 μ l de la muestra con los respectivos controles. Además, fueron utilizados 5 μ l los marcadores de tamaño molecular DNA Ladder RTU (Clever Scientific, UK) para el primer carril. La cámara de electroforesis fue llenada con buffer de corrida preparado a 1X. Se mantuvo el corrimiento de 80-120 V hasta que las muestras se separaron en el gel. Luego, el gel fue visualizado con ayuda de un transiluminador de luz UV[®] (UVP, Germany) y fotografiado para realizar el análisis densitométrico empleando el software Image J[®] (NIH, USA).

5.7 Determinación de TGF- β . Para determinar la producción de TGF- β por las células tumorales de CaCu, 1×10^5 células CaSki cultivadas en MC o TE fueron subcultivadas durante 24 hrs con medio OptiMEM en ausencia de SFB. Posteriormente, se tomaron muestras de los sobrenadantes para determinar los contenidos de TGF- β mediante la técnica de ELISA utilizando el kit Quantikine de TGF- β 1 humano (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Brevemente, la preparación de la placa se realizó de la siguiente manera. Se hizo una dilución del anticuerpo de captura en PBS sin proteína transportadora. Inmediatamente después se colocaron en la placa 100 μ l del anticuerpo de captura diluido en cada pozo. Se tapó la placa y se dejó incubando a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, se hizo una aspiración del sobrenadante de cada pocillo y se lavó 3 veces con 400 μ l de wash buffer. Posteriormente, se hizo el bloqueo de los pozos con 300 μ l de buffer de bloqueo incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó la aspiración del sobrenadante para poder agregar las muestras de los cultivos.

Una vez preparada la placa de 96 pozos se colocaron los sobrenadantes de los cultivos de células CaSki (MC y TE) en el reactivo diluyente en un volumen total de 100 µl por pozo, luego se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con wash buffer y se aspiró el sobrenadante para posteriormente incubarlo con 100 µl de la solución de Streptavidin HRP-B durante 20 minutos protegido de la luz a temperatura ambiente.

Luego se realizó un lavado con wash buffer, aspirando el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 100 µl de sustrato a cada pozo dejando en incubación durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Terminado el tiempo se añadieron 50 µl de solución stop proporcionada por el proveedor.

Inmediatamente después, se determinó la densidad óptica de cada pozo con la ayuda de un lector de placas a una longitud de 450 nm.

5.8 Análisis estadístico. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Se utilizó la prueba *t* de Student para realizar comparaciones utilizando el software SPSS, versión 12.1 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). $P < 0.05$ fue considerado para indicar una diferencia estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1 GENERACIÓN DE TE A PARTIR DE CÉLULAS TUMORALES DE CaCU

Las células CaSki de CaCU, se conocen por tener una gran capacidad de proliferación al ser sembradas bajo condiciones adherentes en cultivo en MC. Para obtener las TE, las células CaSki fueron cultivadas a baja densidad, 1×10^4 células en placas de 6 pozos de ultra-baja adherencia, y resembradas semanalmente durante tres 3 ocasiones. Finalmente se hizo cultivo por dilución limitante y las clonas seleccionadas fueron cultivadas nuevamente en las placas de ultra-baja adherencia y resembradas dos veces antes de llevar a cabo los objetivos experimentales. En la figura 9 se muestran fotografías representativas de las células CaSki cultivadas en MC a un aumento de 4X (Fig. 9A) y 10X (Fig. 9B). Asimismo, se muestran las TE generadas por las clonas obtenidas por dilución limitante, después de 14 días de cultivo, a un aumento de 4X (Fig. 9C) y 10X (Fig. 9D). Las estructuras compactas de las TE formadas por las células CaSki bajo nuestras condiciones de cultivo son muy similares a las reportadas por Däster *et al.*, 2016 y Ortiz-Sánchez *et al.*, 2016 con células de cáncer colorectal y CaCU, respectivamente.

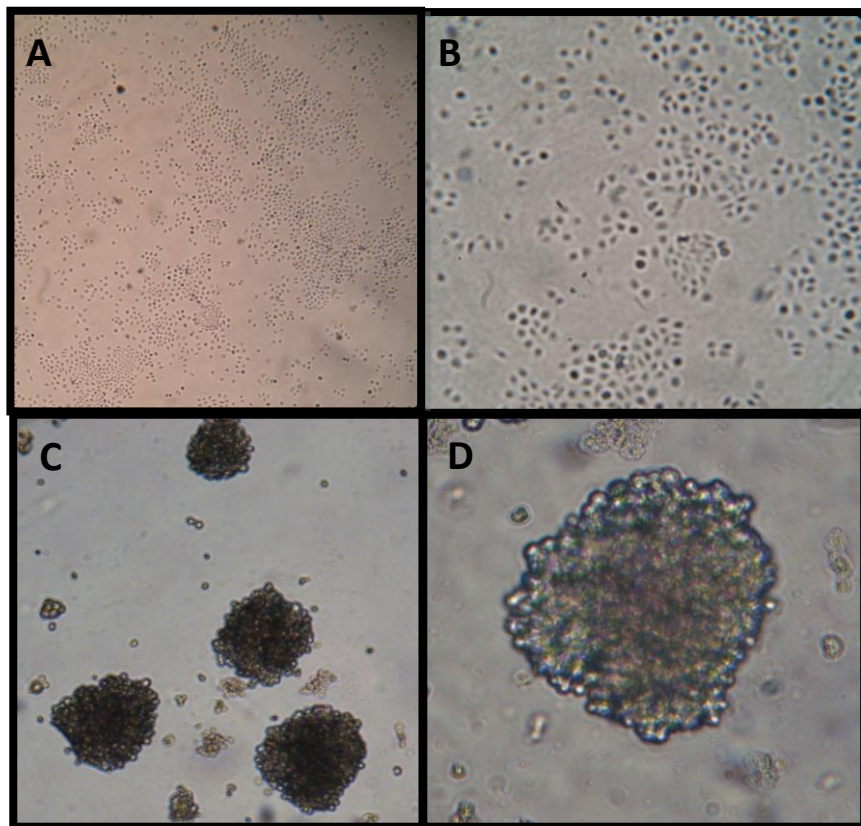


Figura 9. Células CaSki cultivadas en Monocapa y Tumoresferas. Se muestran fotografías de células CaSki cultivadas en MC en aumento a 4 X (A) y 10 X (B), respectivamente. Células CaSki seleccionadas mediante cultivos seriados en TE, dilución limitante y TE de 14 días en cultivo son mostradas a 4 X (C) y 10 X (D), respectivamente.

6.2 CÉLULAS TUMORALES DE CaCU CULTIVADAS EN TE MUESTRAN MAYOR EXPRESIÓN DE CD73 Y ARs EN RELACIÓN A LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MC

Es conocido que la activación transcripcional de CD73 dentro del microambiente tumoral está influenciada por las condiciones hipóxicas que prevalecen en este lugar (Synnestved *et al.*, 2002). Tomando en cuenta que en el interior de las TE las condiciones de hipoxia incrementan notablemente (Däster *et al.*, en el 2016), se procedió a analizar la expresión de CD73 en las células CaSki cultivadas en TE y compararla con la mostrada por las células cultivadas en MC. Mediante citometría de flujo se detectó un incremento importante en la expresión de CD73 en las células cultivadas en TE (IMF=15507) respecto a las cultivadas en MC (IMF=8976) (Figura 10). El incremento en la expresión de la proteína CD73 también correspondió con el incremento en la expresión de RNAm para esta molécula en las células tumorales CaSki cultivadas en TE. A través del análisis de la expresión de RNAm de CD73 mediante RT-PCR se encontró una expresión relativa de CD73/H6PD de 3.5 en las células obtenidas de TE y de 1 en las células cultivadas en MC (Figura 11). Lo cual indica que la condición de cultivo de las células CaSki en TE favorece el incremento en la expresión de CD73 en las células tumorales.

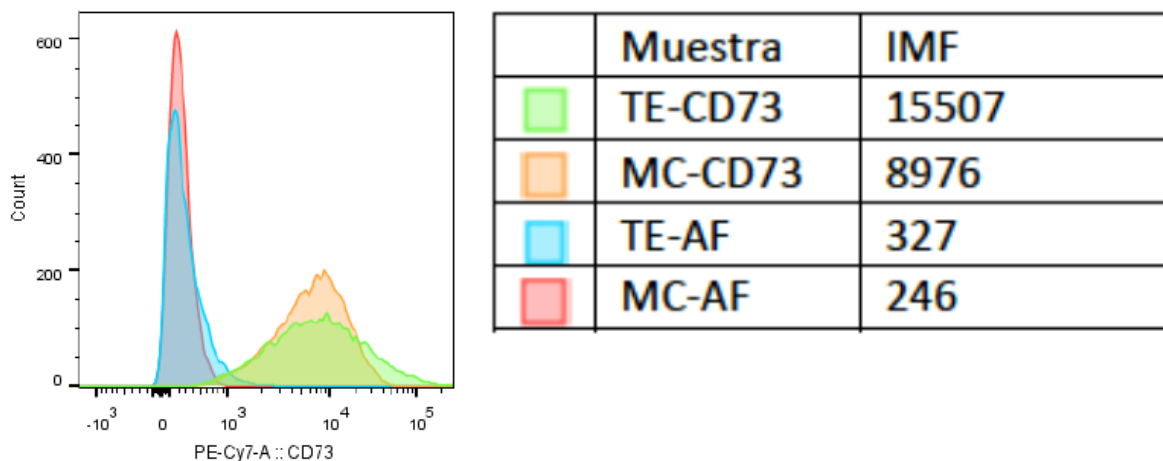


Figura 10. Expresión de CD73 en células tumorales CaSki cultivadas en MC y TE. Células CaSki cultivadas durante 14 días en tumoresferas (TE) o en monocapa (MC) fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de la proteína CD73. **(A)** Se muestra el histograma y la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD73 en células tumorales CaSki cultivadas en MC y TE. AF, Autofluorescencia. Experimento representativo de tres realizados de manera independiente.

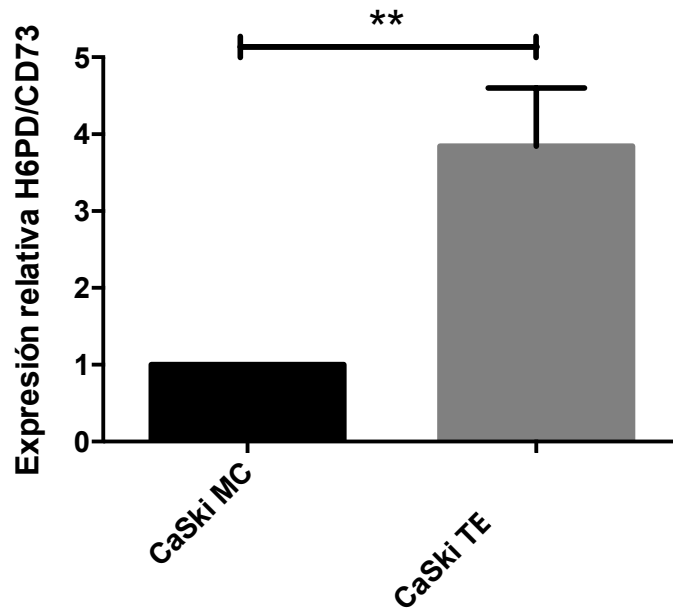


Figura 11. Expresión de ARNm de CD73 en células CaSki cultivadas en MC y TE. Se muestra la expresión relativa de ARNm de los genes CD73/H6PD en células CaSki cultivadas durante 14 días en tumoresferas (TE) o en monocapa (MC). Se muestra un ensayo representativo de RT-PCR de tres realizados de manera independiente. **, Indica diferencia significativa ($p < 0.001$)

Por otro lado, es conocido que la expresión de los ARs y su activación por Ado puede promover la migración y metástasis de las células tumorales (Shi *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2019; Giacomelli *et al.*, 2018). Por tanto, se procedió a analizar la expresión de A1R, A2AR, A2BR y A3R en las células CaSki cultivadas en TE y MC. Mediante citometría de flujo se observó que en más del 50% de la población de las células CaSki cultivadas en TE, se detectó alta expresión de A1R, A2BR y A3R respecto a la mostrada por las células CaSki cultivadas en MC (Figura 12).

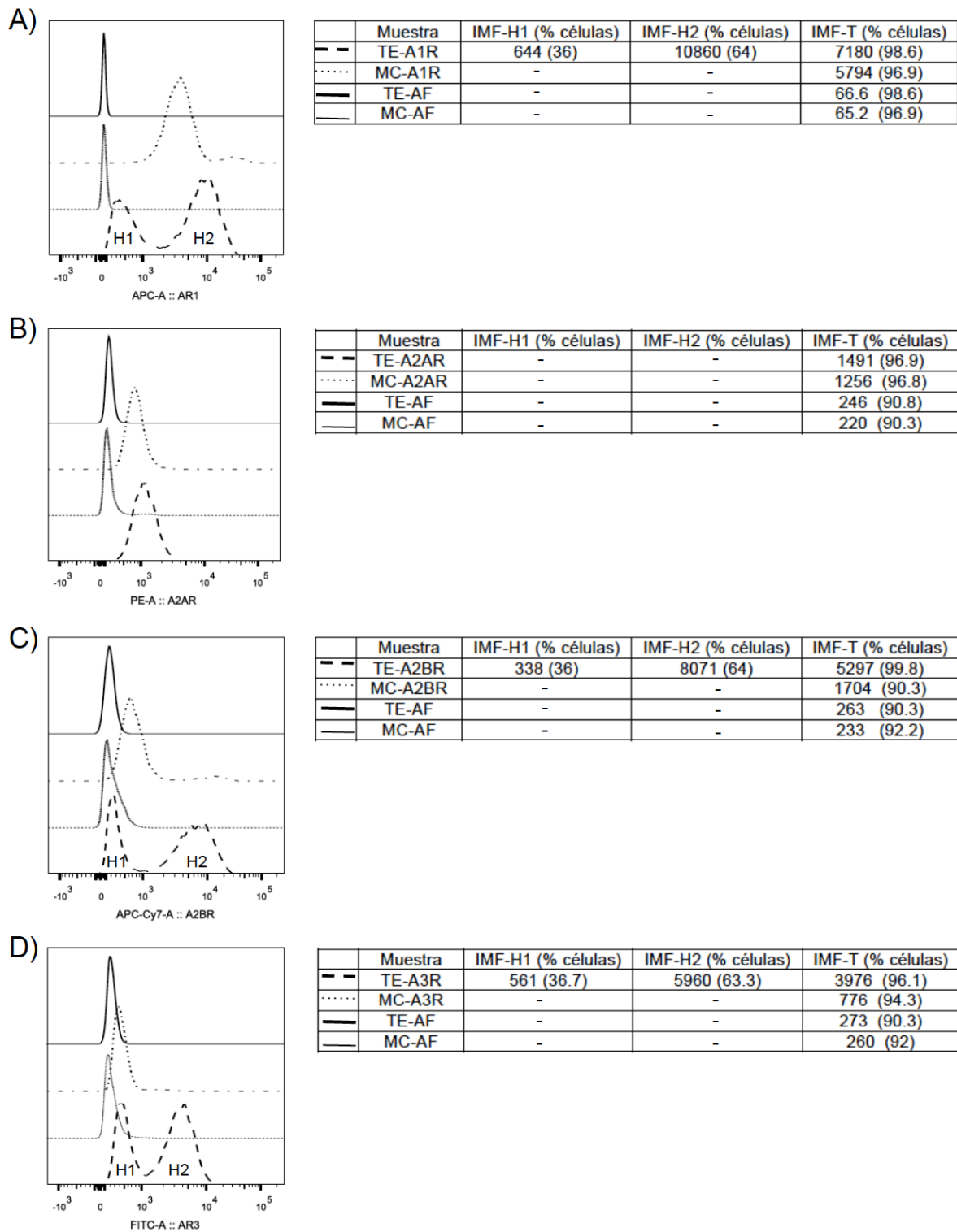


Figura 12. Expresión de ARs en células tumorales CaSki cultivadas en MC y TE. Se muestran los histogramas y las Intensidades Medias de Fluorescencia (IMF) de **(A)** A1R, **(B)** A2AR, **(C)** A2BR, y **(D)** A3R en células tumorales CaSki cultivadas en Monocapa (MC) y Tumoresferas (TE). AF, autofluorescencia. H1, histograma de baja expresión (Izquierda); H2, histograma de alta expresión (Derecha). Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente.

6.3 CÉLULAS TUMORALES DE CACU CULTIVADAS EN TE HIDROLIZAN AMP DE MANERA MÁS EFICIENTE QUE LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN MC

La ectonucleotidasa CD73 se caracteriza por ser la principal enzima que hidroliza AMP para convertirla en Ado. Para analizar la actividad hidrolítica de CD73 en las células CaSki cultivadas en TE y MC, 1×10^6 células cultivadas bajo estas condiciones fueron incubadas durante 6h en presencia de 5mM de AMP y en presencia o ausencia de APCP, inhibidor específico de CD73. Al analizar los productos de la reacción en los sobrenadantes de los cultivos celulares, se observó que las células CaSki provenientes de cultivos en TE, mostraron mayor capacidad para hidrolizar AMP en Ado (Figura 13, indicado con flechas). La adición de APCP, inhibidor específico de CD73, a las células CaSki obtenidas bajo ambas condiciones de cultivo, inhibió completamente la actividad enzimática de CD73.

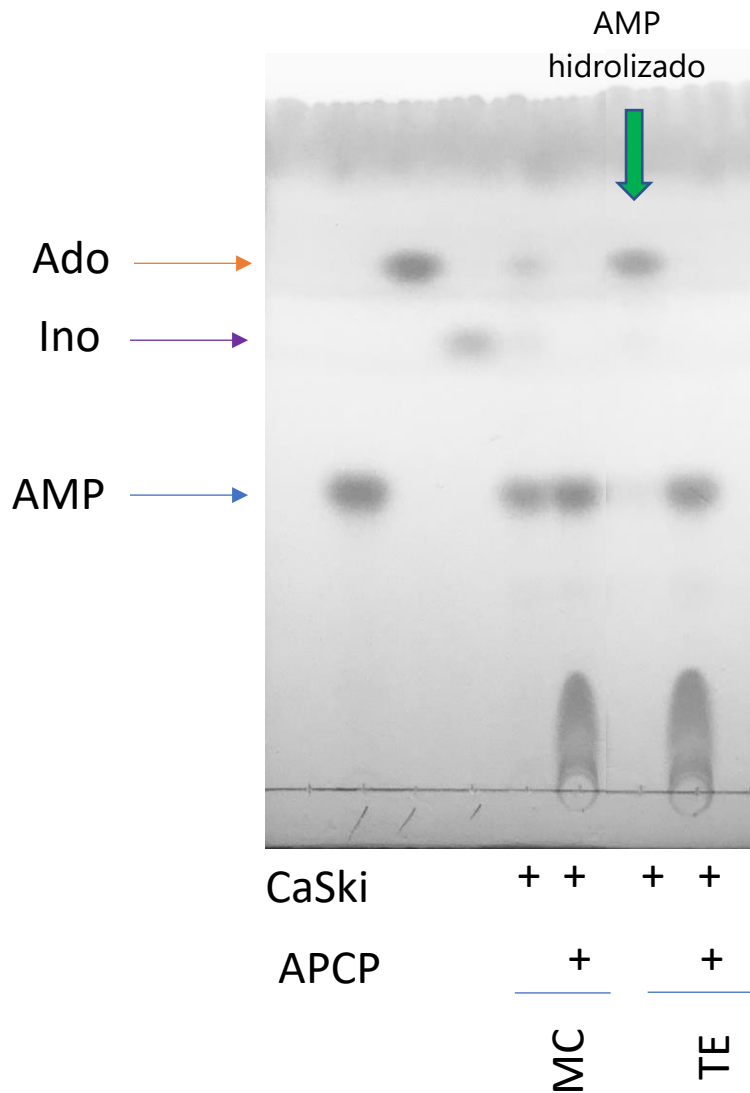


Figura 13. Actividad enzimática de CD73 en las células CaSki cultivadas en TE y MC. Se muestran mediante cromatografía en capa los productos de la reacción de la hidrólisis de AMP en adenosina (Ado) e inosina (Ino) a través de la actividad de CD73 presente en las células CaSki cultivadas en tumoresferas (TE) y monocapa (MC). APCP: Adenosine 5' (α , β -methylene diphosphate). Los + indican la presencia de CaSki en el cultivo y la adición de APCP.

6.4 CÉLULAS DE CACU CULTIVADAS EN TE SOBRES-EXPRESAN EL GEN *Snail* EN RELACIÓN A LAS CULTIVADAS EN MC

Se sabe que la TEM es un proceso fundamental en las células de cáncer debido a que capacita a las células para la migración y la invasión. Además, este fenómeno puede estar regulado por distintos factores como la hipoxia o la presencia de TGF- β (Muz *et al.*, 2015; Zavadil *et al.*, 2005). Por ello, en este estudio mediante un modelo de TE, se decidió evaluar la expresión de Factores de Transcripción maestros de la TEM, tales como Snail y Twist.

La expresión de los genes *Twist* y *Snail* se analizó mediante RT-PCR en células CaSki cultivadas durante 14 días ya sea en TE o en MC. La expresión relativa de Twist/H6PD se redujo notablemente en las células CaSki cultivadas en TE en relación a las células cultivadas en MC, no obstante, la expresión relativa de Snail/H6PD incrementó aproximadamente 15 veces en las células CaSki cultivadas en TE respecto a las cultivadas en MC (Figura 14).

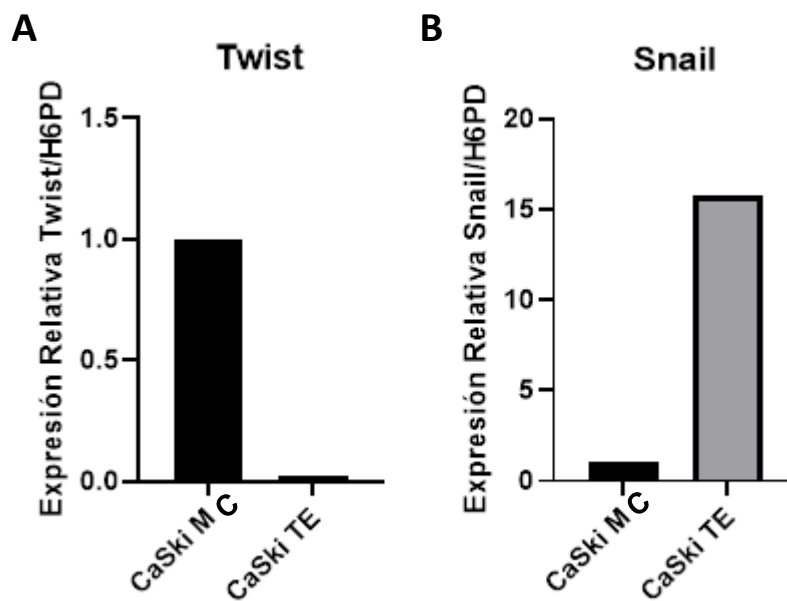


Figura 14. Expresión de Factores de Transcripción asociados con la TEM en las células CaSki cultivadas en TE y MC. Se muestran las gráficas con de la expresión relativa de los genes Twist/H6PD (A) y Snail/H6PD (B) en las células CaSki cultivadas en Monocapa (MC) o Tumoresferas (TE).

6.5 CÉLULAS TUMORALES DE CaCU CULTIVADAS EN TE MUESTRAN SIMILAR EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y PRODUCEN GRANDES CANTIDADES DE TGF- β .

Se ha reportado que la inducción de la TEM en células tumorales está fuertemente asociada tanto con la expresión de HIF-1 α (Däster *et al.*, 2016), como con el incremento en la expresión de *Snail* y la señalización de TGF- β (Lee *et al.*, 2020). Con la finalidad de averiguar si la expresión de HIF-1 α y la producción de TGF- β estaban asociadas con el incremento en la expresión de *Snail* en las células CaSki cultivadas en TE, ambas moléculas fueron analizadas en las células CaSki cultivadas en TE y comparadas con las cultivadas en MC. Mediante RT-PCR se encontró una expresión relativa de HIF-1 α / β -actina de manera similar entre las células cultivadas en ambas condiciones de cultivo (Figura 15).

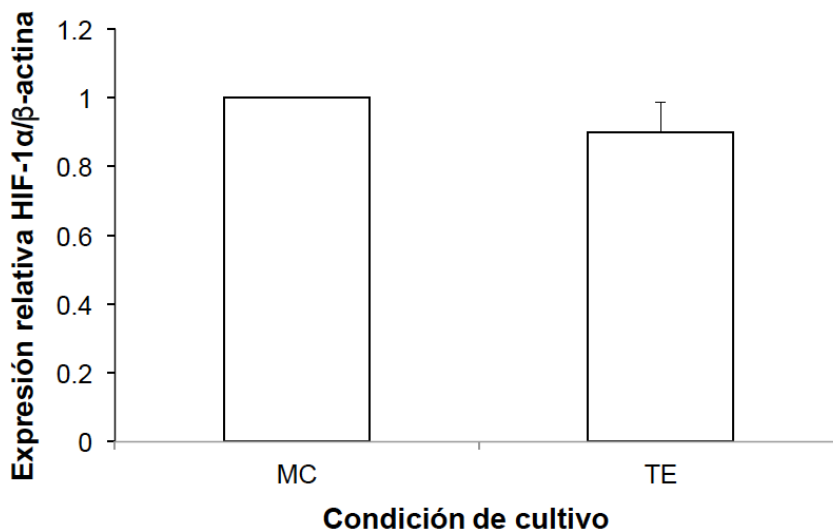


Figura 15. Detección de HIF-1 α por RT-PCR en células tumorales de CaCU cultivadas en M y TE. (A) Se muestra el promedio de la expresión relativa de ARNm de HIF-1 α / β -actina de tres ensayos realizados en células tumorales CaSki cultivadas en Monocapa (MC) y en Tumoresferas (TE).

Por otro lado, para determinar la producción de TGF- β en los cultivos celulares, 1×10^5 células tumorales CaSki cultivadas en MC o TE fueron incubadas durante 24 horas con medio OptiMEM en ausencia de SFB, posteriormente los contenidos de TGF- β fueron analizados mediante ELISA. De manera interesante se observó que después de 24hrs los sobrenadantes de las células CaSki provenientes del cultivo en TE contenían aproximadamente el doble de la cantidad de TGF- β que los sobrenadantes derivados de células CaSki cultivadas en MC, 80 ± 7.8 pg/ml y 40 ± 3.9 pg/ml, respectivamente (Figura 16). Estos resultados permiten sugerir que el incremento en la expresión de *Snail* de las células CaSki cultivadas en TE, se puede asociar con la mayor cantidad de TGF- β producida por las células CaSki cultivadas bajo estas condiciones.

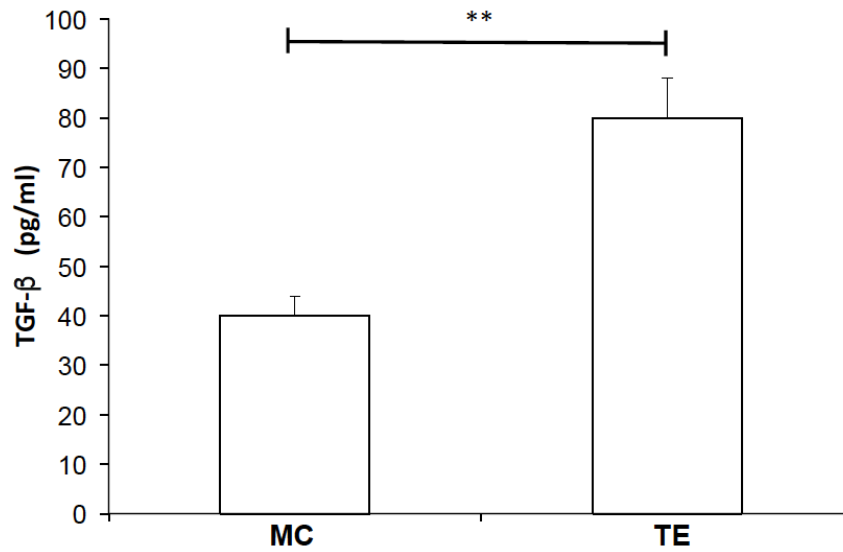


Figura 16. Producción de TGF-β de células CaSki cultivadas en MC y TE. Células CaSki (1×10^5) cultivadas previamente durante 14 días en TE o en MC fueron cultivadas durante 24 hrs con medio OptiMEM sin SFB. Posteriormente se analizaron los contenidos de TGF-β de los sobrenadantes mediante ELISA. Ensayo representativo de tres realizados de manera independiente. **, indica diferencias significativas ($p < 0.001$).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El CaCU es un problema importante de salud pública en México, el cual se ha posicionado como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, ubicándose sólo por debajo del Cáncer de Mama (INEGI, 2018). Entre las pacientes que padecen CaCU, la principal causa de muerte es la metástasis, por lo que resulta de gran relevancia utilizar herramientas que permitan hacer acercamientos experimentales más precisos para dilucidar de forma adecuada los mecanismos que conducen a la diseminación de las células tumorales, así como determinar los factores que influyen en este proceso.

En este contexto, se ha estudiado el microambiente tumoral para dilucidar los mecanismos que condicionan a las células tumorales para adquirir propiedades que les permiten migrar y poblar otros sitios en el huésped. Se ha señalado a la hipoxia como un factor del microambiente tumoral que favorece el proceso de metástasis (Semenza, 2000; Rankin *et al.*, 2016). Actualmente, se sabe que el mecanismo principal por el cual las células son capaces de adaptarse a esta condición es la regulación de factores de transcripción inducibles por hipoxia conocidos en conjunto como HIF-1 (Semenza, 2009). En donde la expresión de HIF-1 α es estable en un ambiente celular con reducida disponibilidad de oxígeno con respecto a la expresión de la subunidad 1 β (HIF-1 β o ARNT) (Semenza, 2001), la cual está expresada de manera constitutiva en condiciones normóxicas. Además, este conjunto de factores se caracteriza por regular algunos genes relacionados con diferenciación celular, angiogénesis y metabolismo anaeróbico (Semenza, 2012) y tiene influencia sobre la expresión de factores de transcripción y proteínas relacionadas con la TEM (Muz *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha descrito que la vía CD73-Ado está vinculada a un mal pronóstico en varios tipos de cáncer debido a que participa en la supresión, proliferación y migración de las células tumorales mediante la generación de grandes cantidades de Ado (Otha, 2016). También se sabe que la activación transcripcional de CD73 dentro del microambiente tumoral está regulada por HIF-1 α (Synnestvedt *et al.*, 2002) y la presencia de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que además estabiliza a HIF-1 α (McMahon *et al.*, 2006). Nuestro grupo de investigación previamente reportó que las células tumorales de CaCU positivas a la infección por VPH tienen alta expresión de CD73 en membrana y son capaces de generar grandes cantidades de Ado (Mora-García *et al.*, 2017). Además, la interacción de Ado con los receptores A2AR y A2BR (hallados en las células tumorales de CaCU) promueve la secreción de TGF- β al espacio extracelular, el cual, a su vez, mantiene la expresión de la ectoenzima CD73 (García-Rocha *et al.*, 2018). Tomando en cuenta que la activación transcripcional de CD73 dentro del microambiente tumoral está influenciada por las condiciones hipóxicas que prevalecen en este lugar (Synnestvedt *et al.*, 2002), y que el cultivo de células tumorales en TE puede recrear condiciones similares, tal como las de hipoxia (Däster *et al.*, 2016), la finalidad de este estudio fue analizar la participación de

la vía CD73-Ado en la inducción de genes relacionados con la TEM. Utilizando el modelo de cultivo de TE a través del cultivo seriado de células CaSki en placas de cultivo de ultra baja adherencia y la técnica de dilución limitante, logramos obtener TE compactas cuyas células presentaron una expresión significativamente mayor de CD73 respecto a las células CaSki cultivadas en MC. Además, se observó que en más del 50% de las células CaSki derivadas de TE hubo un incremento en la expresión de los receptores para adenosina A1R, A2BR y A3R. De manera interesante, se encontró que la mayor expresión de CD73 en las células cultivadas en TE correspondió con una mayor capacidad de estas células para hidrolizar al nucleótido AMP y convertirlo en Ado. Al analizar la expresión de los genes maestros de la TEM, *Snail* y *Twist*, se encontró que sólo el gen *Snail* fue sobre-expresado en las células CaSki cultivadas en TE respecto a las células cultivadas en MC. Dado que se ha reportado que la inducción de la TEM en células tumorales está fuertemente asociada, tanto con la expresión de HIF-1 α (Däster *et al.*, 2016), como con el incremento en la expresión de *Snail* y la señalización de TGF- β (Lee *et al.*, 2020), al analizar la expresión de HIF-1 α y TGF- β en las células CaSki, observamos que HIF-1 α no mostró cambios en la expresión en las células CaSki cultivadas en TE respecto a las cultivadas en MC; sin embargo, se observó que las células CaSki cultivadas en TE produjeron significativamente mayor cantidad de TGF- β respecto a las cultivadas en MC. Estos resultados permiten sugerir que las células CaSki cultivadas bajo las condiciones de TE son capaces de adquirir nuevas características que potencian su capacidad protumoral, como la migración.

La generación de TE a partir de células tumorales de CaCU ya ha sido reportada previamente (Ortiz-Sánchez *et al.*, 2016), encontrándose que ese sistema de cultivo permite inducir la expresión de marcadores de troncalidad en las células tumorales, tales como Oct-4, Sox-2 y Nanog, indicando que bajo estas condiciones de cultivo se pueden recrear eventos que suceden en un microambiente tumoral. Por otra parte, al analizar la importancia de HIF-1 α en los procesos biológicos como la proliferación, apoptosis, ciclo celular, invasión, así como la muerte celular por autofagia, utilizando el cultivo de células CaSki en cámara hipóxica, se observó que bajo estas condiciones HIF-1 α incrementó en las primeras horas de exposición y se mantuvo constante después de las 24 hrs de exposición. De manera interesante, la desregulación de este factor de transcripción generó un arresto mayor en G1 y G2, además de disminuir la fase S del ciclo celular e inhibir la capacidad invasora de las células tumorales en Matrigel (Jiang *et al.*, 2017). Lo cual indica que la expresión de este factor es esencial en estos procesos biológicos de las células de CaCU. En otro estudio, utilizando células de CaCU HeLaS3, una línea celular adaptada a crecer en suspensión, Jewell y colaboradores en el 2001, encontraron que se requieren sólo de 2 minutos de exposición a hipoxia para que HIF-1 α se haga presente, alcanzando su punto máximo de expresión en el minuto 32 (Jewell *et al.*, 2001). Las células tumorales CaSki cultivadas bajo nuestro sistema de cultivo de TE no produjo cambios en la expresión de HIF-1 α respecto a las cultivadas en MC, por lo que los cambios observados en la expresión de CD73, ARs y *Snail* en estas células pudieran

asociarse a otros factores.

En nuestro modelo experimental de TE, esperábamos un aumento importante de la expresión del Factor de Transcripción HIF-1 α debido a que, en el cultivo empleado aquí, se podrían estar generando las condiciones hipóxicas como las de un tumor sólido como la de pocos nutrientes y poco oxígeno. Las células que se someten a escasez de nutrientes y a hipoxia se adaptan a su entorno mediante el aumento de expresión de HIF-1 α . El hecho de no encontrar un aumento en HIF-1 α puede ser explicado porque la vida media de este Factor de Transcripción es corta. Nuestro modelo consiste en mantener a las células durante varios días en la estructura de TE, por lo cual es probable que la expresión de HIF-1 α no permanezca para el momento en el que se llevan a cabo los experimentos.

En trabajos previos con células tumorales de diferentes tipos de cáncer ginecológico, como en el caso de cáncer de ovario, se observó que estas células además de tener mayor capacidad de formación de Tumoresferas, presentan mayor expresión de CD73 y de factores de transcripción relacionados con la TEM como SNAIL1, SNAIL2 y TWIST2 cuando son comparadas con células de Epitelio de Trompa de Falopio (Lupia *et al.*, 2018). Además, la desregulación del gen de CD73 resultó en una baja expresión de genes claves en la TEM como SNAIL1, TWIST1 y ZEB1, así como disminución en el fenotipo mesenquimal de las células tumorales, permitiendo una disminución de N-cadherina y vimentina y un aumento de E-cadherina. (Lupia *et al.*, 2018). En contraste, la sobre expresión de CD73 incrementó la presencia de algunas moléculas importantes de la TEM como β -catenina, Snail, Vimentina y la disminución de la proteína E-cadherina (Xu *et al.*, 2020). En nuestro estudio, al analizar la expresión de los factores de transcripción maestros asociados con la TEM (Snail, Twist), logramos evidenciar la sobre-expresión del gen de *Snail* y la desregulación de *Twist* en las células cultivadas en TE respecto a las cultivadas en MC. También corroboramos que las células cultivadas en TE tienen mayor capacidad para hidrolizar AMP que las cultivadas en MC, y que más del 50% de la población de las células cultivadas en TE sobre-expresaban los receptores de Ado A1R, A2BR y A3R. Por lo que sería interesante analizar en estudios posteriores si las células situadas en la porción más interna de las tumoresferas corresponden con las que presentan mayor expresión de estos receptores y si la señalización de Ado a través de alguno de estos receptores pueda influir en la expresión de moléculas participantes en la TEM. En este contexto, se ha observado que células epiteliales pulmonares que son propensas a presentar fibrosis, al adquirir un fenotipo mesenquimal, el receptor A2BR presentó una expresión 200 veces mayor cuando se comparó con A1R, mientras que A2AR y A3R mantuvieron su expresión basal. Además, al realizar un análisis morfológico de las células se dieron cuenta de que la activación del receptor A2BR resultó en una TEM parcial, por lo que el A2BR puede considerarse un receptor que participa en la adquisición del fenotipo mesenquimal, aunque probablemente no es el único implicado (Giacomelli *et al.*, 2018).

Por otro lado, la expresión de Snail se correlaciona con el grado de evolución del tumor, la metástasis ganglionar en varios tipos de tumores y predice un mal resultado en pacientes con cáncer metastásico. Las evidencias emergentes indican que Snail causa

una reprogramación metabólica, otorga a las células tumorales rasgos similares a las de las células madre cancerosas y, además, promueve la resistencia a los medicamentos, la recurrencia del tumor y la metástasis. En nuestro estudio encontramos que en las células CaSki cultivadas en TE este factor de transcripción incrementó aproximadamente 15 veces respecto a las células cultivadas en MC. En este sentido, se ha reportado que TGF- β juega un papel importante en la inducción de la TEM en las células tumorales de diversos tipos de tumores (Zavadil *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2020), y que la señalización de esta citocina sobre su receptor, incrementa la expresión del gen *Snail* (Wang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2020). En nuestro estudio encontramos que las células tumorales cultivadas en TE producen mayores cantidades de TGF- β en relación a las cultivadas en MC, lo que sugiere que este factor de crecimiento está participando en la inducción de *Snail* en las células cultivadas en TE.

En el año 2010, Yin y colaboradores mostraron una evidencia experimental de que TGF- β participa en la inducción de Snail en células de cáncer de mama. Esta observación se hizo mediante el Factor activador de la transcripción 3 (ATF3) el cual es activado por TGF- β lo cual, provoca que se induzca la expresión de Snail, Slug, y Twist mejorando la motilidad celular (Yin *et al.*, 2010)

En conclusión, el modelo de cultivo de TE de células tumorales CaSki de CaCU permitió evidenciar que la expresión de CD73 y de algunos ARs es inducida bajo estas condiciones de cultivo. De manera importante se observó que tanto la producción de TGF- β como la de *Snail*, también es inducida de manera importante. Indicando que este modelo de cultivo puede ayudar a recrear algunas de las condiciones que prevalecen en el microambiente tumoral para favorecer la progresión del tumor. No obstante, es necesario corroborar estas evidencias de manera funcional en otras líneas celulares de CaCU y cotejarlas con muestras de tejido tumoral para confirmar estos hallazgos, lo cual ayudará a tener un mayor entendimiento de la participación de la vía CD73-Ado en el desarrollo de la TEM.

8. CONCLUSIONES

El modelo de cultivo de TE de células tumorales CaSki de CaCU permitió evidenciar que la expresión de CD73 y de algunos ARs es inducida bajo estas condiciones de cultivo. Asimismo, la producción de TGF- β 1 y la inducción de *Snail*, también aumentó de manera importante en las células tumorales. Por tanto, este modelo de cultivo puede ayudar a recrear algunas de las condiciones que prevalecen en el microambiente tumoral para favorecer la progresión del tumor. No obstante, es necesario corroborar estas evidencias de manera funcional en otras líneas celulares de CaCU y cotejarlas con muestras de tejido tumoral para confirmar estos hallazgos, lo cual ayudará a tener un mayor entendimiento de la participación de la vía CD73-Ado en el desarrollo de la TEM.

9. PERSPECTIVAS

- Detectar bajo las condiciones ya establecidas, la expresión de HIF-1 α , CD73 ARs y los marcadores de la TEM en cultivos en MC y TE de otras líneas celulares de CaCU para confirmar los hallazgos obtenidos.
- Evaluar la proliferación celular en cultivos de células tumorales de CaCU en MC y TE utilizando células de biopsias de tumores.
- Analizar si la interacción de adenosina con los ARs promueve la expresión de marcadores de la TEM en las células cultivadas en TE.
- Realizar ensayos funcionales para examinar la capacidad invasora y migratoria de las células de CaCU provenientes del cultivo en TE.
- Utilizar otras técnicas (como la microscopía confocal o la inmunohistoquímica) que permitan conservar la estructura de TE y para poder analizar las moléculas de nuestro interés.

10. LITERATURA CITADA

- Abousamra N., Salah M., Hamza E. Et al. 2015. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1(E-NTPDase1/CD39) as a new pronostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*; 56:113-119.
- Al W., Dale T., Al-Jumaily R., and Forsyth N. 2019. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front Cell Dev Biol*; 7:1-15.
- Alique M., Sánchez E., Bodega G. 2020. Hypoxia-Inducible Factor-1 α : The Master Regulator of Endothelial Cell Senescence in Vascular Aging. *Cells*; 9(1): 195.
- Antonioli L., Haskó G., Fornai M. *et al.* 2014. Adenosine pathway and cancer: Where do we go from here? *Expert Opin Ther Targets*; 18:973-977.
- Antonioli L., Yegutkin G., Pacher P. et al. 2016. Anti-CD73 in Cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer*; 2: 95-109.
- Azambuja J., Gelsleichter N., Beckenkamp L. et al. 2019. CD73 downregulation Decreases in vitro and in vivo Glioblastoma Growth. *Molecular Neurobiology*; 56: 3260-3279.
- Bertout A., Palet A., Simon C. 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*; 8:967-975.
- Birner P., et al. 2000. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*; 60:4693-4696.
- Bosch F., Broker T., Forman D. 2013. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*; 31: 7.
- Breslin S. and O'Driscoll L. 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*; 18: 240-249.
- Brianti P., De Flammineis E. and Mercury S. 2017. Review of HPV-related diseases and cancer. *New Microbiologic*; 40: 80-85.
- Calle X., Jiménez D., Muñoz F. et al. 2019. Mecanismo sensor y de adaptación a los niveles de oxígeno y su implicancia en las enfermedades cardiovasculares: a propósito del Premio Nobel de Fisiología-Medicina 2019. *Rev Chil Cardiol*; 38:225-235.
- Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D. Et al. 2017. Induction of hypoxia and necrosis in multicelular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*; 8:1725-1736.
- Dunne F., Unger R., Stenberg M. et al. 2007. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*; 297:813-819.
- Flamme I., Frohlich T., von Reutern M. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanism of development*; 63:51-60
- Fraga A., Ribeiro M., Medeiros R. 2009. Hipoxia tumoral. Papel del Factor Inducible por Hipoxia. *Acta Urológica Española*; 33:941-951.
- Francí C., Takkunen M., Dave N. et al. 2006. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*; 25:5134-5144.

- Fredholm B., Ijzerman A., Jacobson K. et al. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*; 53:527-552.
- García R., Monroy A., Hernández J. et al. 2018. Cervical Cancer cells produce TGF- β 1 through the CD73-adenosine pathway and maintain CD73 Expression through the autocrine activity of TGF- β 1. *Cytokine*; S1043-4666(18)30385.
- Gavert N., Ben-Ze'ev, A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine*; 14:199–209.
- Giacomelli C., Daniele S., Romei C. et al. 2018. The A(2B) Adenosine receptor modulates the epithelial mesenchymal transition through the balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK pathway activation in human epithelial lung cells. *Front Pharmacol*; 31:9-54.
- Giacomelli Ch., Daniele S., Romei Ch. et al. 2018. The A2B Adenosine Receptor modulates the Epithelial-Mesenchymal Transition through the balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK pathway activation in human epithelial lung cells. *Front Pharmacol*; 9:54.
- Gleadle M. and Ratcliffe J. 1997. Induction of hypoxia inducible factor 1, erythropoietin, vascular endothelial grow factor, and glucose transporter 1 by hypoxia: evidence against a regulatory role of Src kinase. *Blood*; 89:503-509.
- Goda N. and Kanai M. 2012. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int J. Hematol*; 95: 457–463.
- Gorain B., Choudhury H., Yee G., Bhattamisra S. 2019. Adenosin Receptors as Novel targets for the treatment of various cancers. *Curr Pharm Des*; 25:2828-2841.
- Grunewald J. & Ridley A. 2010. CD73 represses pro-inflammatory responses in human endothelial cells. *J Inflamm*; 7:10.
- Gupta S., Pramanik J. 2019. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. *Journal of Biomedical Science*; 26.
- Hanahan D. and Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*; 144:
- Hay E. 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*; 233:706-720.
- Huang Y., Gu Z., Fan Y. Et al. 2018. Inhibition of the Adenosinergic pathway: the indispensable part of oncologic therapy in the future. *Purinergic signaling*; 15:53-67.
- INEGI. 2018. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
- Jaakkola P., Mole D., Tian Y. et al. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by α 2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*; 292:468-472.
- Jewell U., Kvietikova I., Scheid A. et al. 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*;15:1312-1323.
- Jiang L., Shi S., Shi Q. et al. 2017. Similarity in the functions of HIF-1 α and HIF-2 α proteins in cervical cancer cells. *Oncology Letters*; 14: 5643-5651.
- Kabashima-Niibe A., Higuchi H., Takaishi H., et al. 2013. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*; 104:157-164.
- Kessler T. 2017. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. *Seminars in Oncology Nursing*; 33:172-183.
- Kim B., Ahn D., Kang N., et al. 2020. TGF-beta induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer. *Sci Rep*; 10:10597.
- Lee R-M. And Lin P-S. 2017. Induction of tumor hypoxia for cancer therapy. U.S. Patent No

2,018,005,003,9A1.

- Lee Y., Park J., Oh S., 2020. Activation of NF-kappa B by TOPK upregulates Snail/Slug expression in TGF-beta1 signaling to induce epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 530:122-129.
- Lupia M., Angiolini F., Bertalot G. et al. 2018. CD73 regulates stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer-Initiating Cells. *Stem Cells Reports*; 10: 1412-1425.
- Majmundar A., Wong W., Simon C. 2010. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*; 40:294-309.
- McMahon S., Charbonneau M., Grandmont S., et al. 2006. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression, *J Biol Chem*; 281: 24171–24181.
- Méndez O., Zavadil J., Esencay M., et al. 2010. Knock down of HIF-1 alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumorspheres. *Mol Canc*; 133–144.
- Mora M., Ávila L., García R. et al. 2017. Cervical Cancer suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cell Immunol*; 320:46-55.
- Muz B., de la Puente P., Azab F., & Azab A. 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Dove Press Journal*; 3:83-92.
- Nieto A. 2011. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 27:347-376.
- Ohta A. 2016. A metabolic immune checkpoint: Adenosine in tumor microenvironment. *Front Immunol*; 7:109.
- Ortiz-Sánchez Et al. 2016. Characterization of cervical cancer Stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and Human papilloma virus co-receptor Expression. *Oncotarget*; 7:31943-31954.
- Philip B., Ito K., Moreno R., Ralph S. 2013. HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. *Carcinogenesis*; 34: 1699-1707.
- Postigo A. 2003. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling *EMBO J*; 22: 2443-2452.
- Rankin E., Nam J. & Giaccia A. 2016. Hypoxia: Signaling in the Metastatic Cascade. *Trends Cancer*; 2:295-304.
- Resta R., Yamashita Y., Thompson L. et al. 1998. Ectoenzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*; 161:95-109.
- Robinson P., Hack C., Merrill E., and Mattie D. 2017. Mathematical Model of HIF-1 Alpha Pathway, Oxygen Transport and Hypoxia. Bethesda, MD: Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine.
- Robson S., Wu H., Sun H. et al. 2005. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost*; 31: 217-233.
- Sanjosé S., Brotons M., Pavón M. 2018. The natural history of human papillomavirus infection. *Best practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*; 47:2-13.
- Saxena M., Balaji S., Deshpande N. et al. 2018. AMP-activated protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition in cancer cells through Twist1 upregulation; *Journal of Cell Science*; 131:14.
- Semenza G. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*; 88: 1474-1480.

- Semenza G. 2001. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Mol Med*; 8:345-350.
- Semenza G. 2010. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Systems Biol Med*; 2:336-361.
- Semenza G. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*; 148:399–408.
- Semenza G. 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*; 33:207-214.
- Shi L., Wu Z., Miao J. et al. 2019. Adenosine interaction with adenosine receptor A2a promotes gastric cancer metastasis by enhancing PI3K-AKT-mTOR signaling. *Mol Biol Cell*; 30:2527-2534.
- Sitkovski M., Hatfield S., Abbot R. et al. 2014. Hostile, Hypoxia-A2-Adenosinergic Tumor Biology as the Next Barrier to Overcome for Tumor Immunologists. *Cancer Immunology Research*; 2: 598-606.
- Stagg J., Smyth M. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*; 29:5346-5358.
- Synnestvedt K., Furuta G., Comerford K., et al. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*; 110: 993–1002.
- Takahashi R. et al. 2003. Hypoxia-inducible factor 1 α expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep*; 10:797-802.
- Talks K. L., Turley, H., Gatter, K. C. et al. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J. Pathol*; 157:411–421.
- Thiery J. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*; 2:442-454.
- Tian H., McKnight S., Russel D. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Development*; 11:72-82.
- Torres Á., Erices J., Sánchez F., Ehrenfeld P. *et al.* 2019. Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A(3) Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Lett*; 446:112-122.
- Troncoso D., Madariaga T., Aldana S., et al. 2017. Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Med*; 58:4.
- Turcotte M., Spring K., Pommey S Et al. 2015. CD73 is associated with Poor prognosis in High-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*; 75:4494-4503.
- Van Welden, S Selfridge & Hindryckx P. 2017. Intestinal hypoxia and hypoxia-induced signalling as therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 14: 596-611
- Vaupel P., and Harrison L. 2004. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*; 9: 4–9
- Vaupel P., Multhoff G. 2016. Commentary: A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment. *Front Immunol*; 7:332.
- Walboomers J., Jacobs M., Manos M. Et al. 1999. Human papillomavirus is necessary cause of cervical cancer worldwide. *J Pathol*; 189:12-19.
- Wang Y., Shi J., Chai K. et al. 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*; 13: 963-972.
- Watts E. and Walmsley S. 2019. Inflammation and hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. *Trends in Molecular Medicine*; 25:33-46.
- Weidemann A. and Johnson R. 2008. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ*; 15: 621–627.

- Wenier C., Booth G., and Semenza G. 1996. *In Vivo* Expression of mRNAs encoding Hypoxia-Inducible Factor 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 225:485-488.
- Winter S. et al. 2006. The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer. *Cancer*; 107: 757-766.
- World Health Organization. Screening as well as vaccination is essential in the fight against cervical cancer.
- Xu Z., Gu C., Yao X. et al. 2020. CD73 promotes tumor metastasis by modulating RICS/RhoA signaling and EMT in gastric cancer. *Cell Death and Disease*; 11:202-216.
- Yamamoto Y. et al. 2008. Hypoxia-inducible factor 1 α is closely linked to aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 110:465-475.
- Yang S., Zhang Z., Hao Y. et al. 2017. HIF1- α induces epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer stem cells through the Snail pathway. *Oncotarget*; 8: 9535-9545.
- Ye X. & Weinberg R. 2015. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol*; 25:675-686.
- Yin X., Wolford C., Chang Y. et al. 2010. AFT3, an adaptive-response gene, enhances TGF- β signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *J Cell Sci*; 123: 3558-3365.
- Zavadil J., Böttinger E. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*; 24: 5764-5774.
- Zhang J., Tian X., Xing, J. 2016. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J Clin Med*; 5(4).
- Zhu J., Huang Z., Zhang M. et al. 2018. HIF-1 α promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model. *Oncology Letters*; 15:3482-3489.
- Zimna A., and Kurpisz, M. 2015. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int*; 549412.